



合成化学で解き明かす糖鎖認識

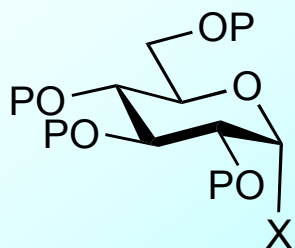
成蹊大学 理工学部
戸谷 希一郎

- ・ グリコシル化反応の基礎
- ・ オリゴ糖合成の事例
- ・ 立体選択的グリコシル化反応の開発
- ・ 化学合成糖鎖を用いた糖タンパク質品質管理機構の解析

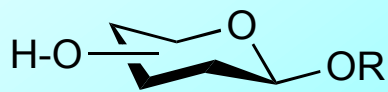
O-グリコシル化反応

糖供与体

糖受容体

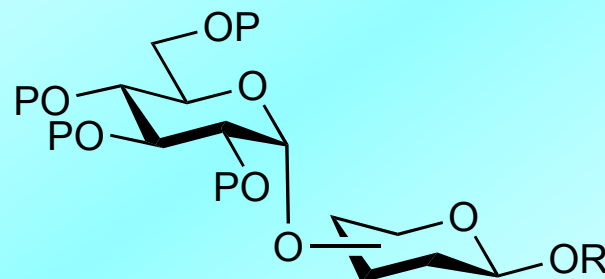


+



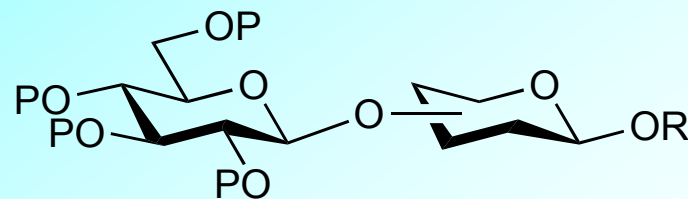
活性化剤

溶媒



α -グリコシド

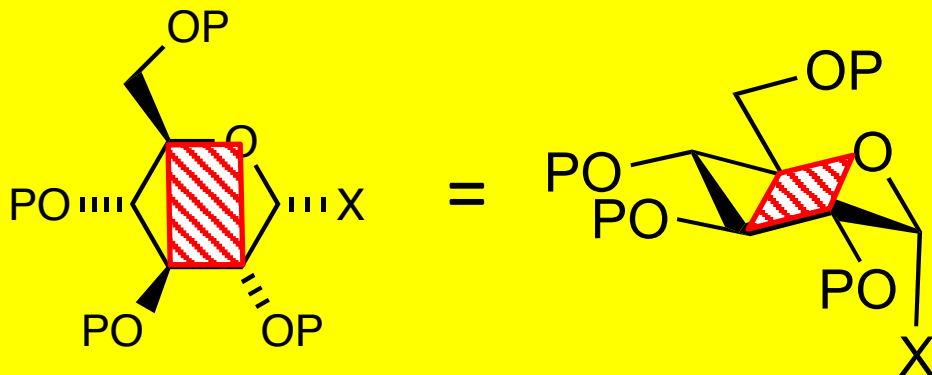
+



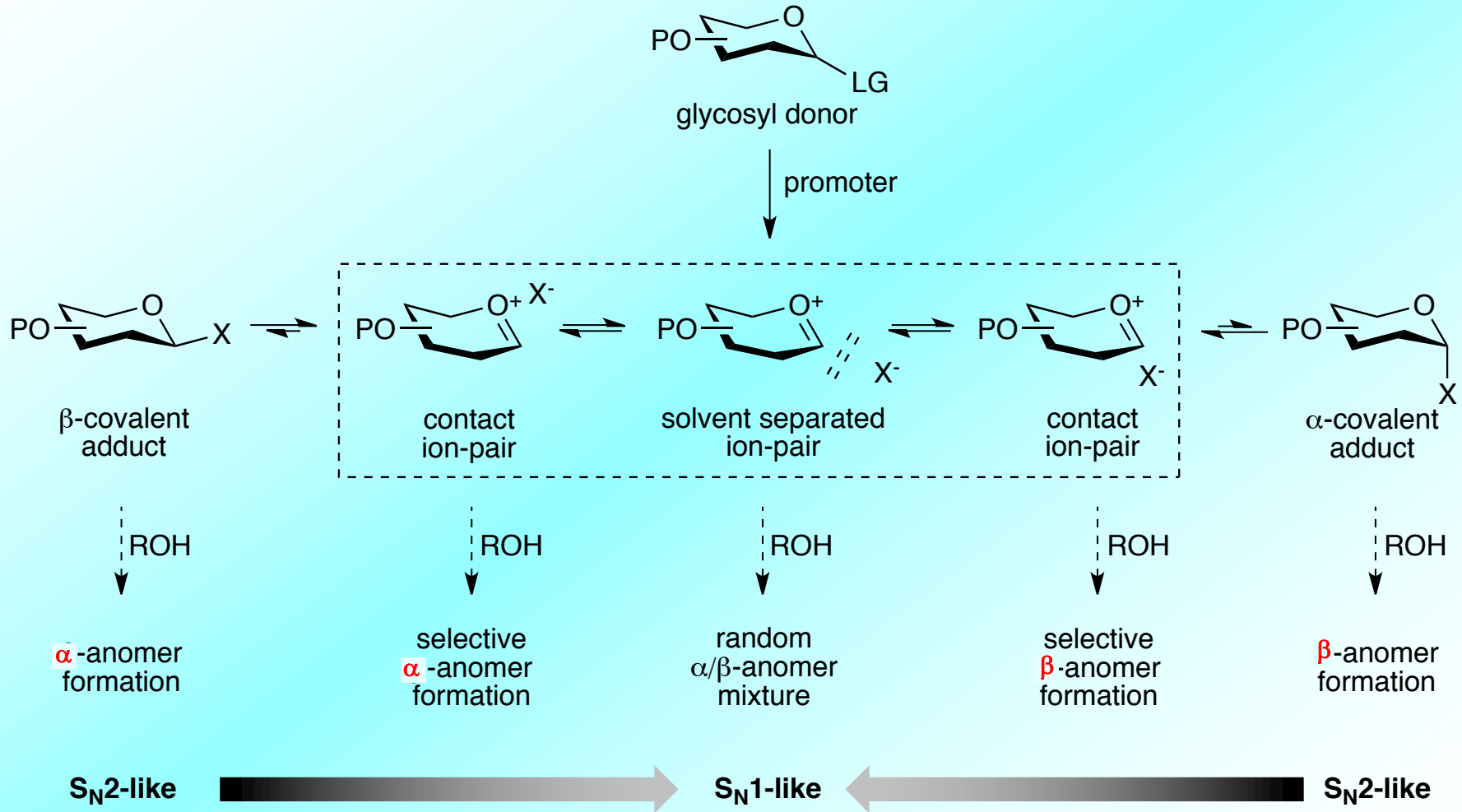
β -グリコシド

P: 保護基

X: 脱離基

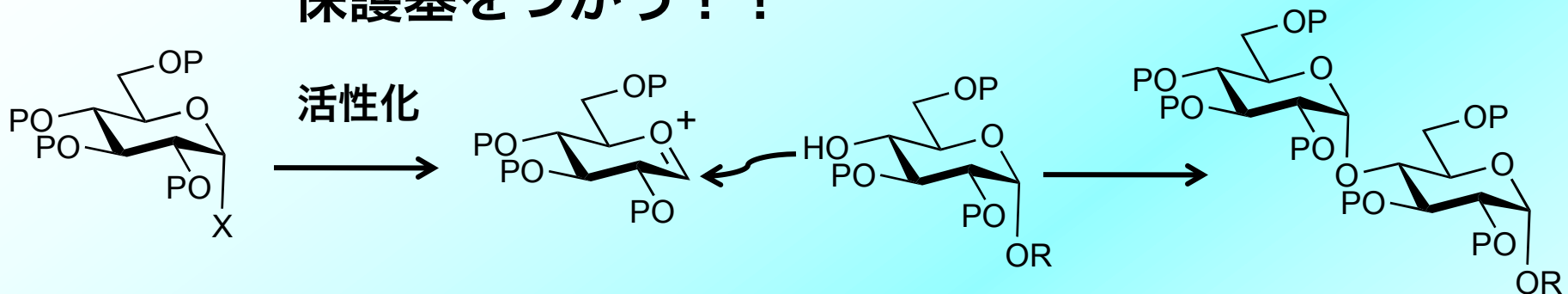


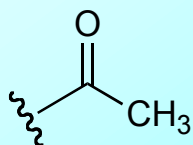
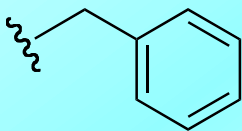
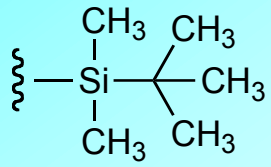
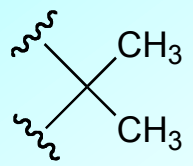
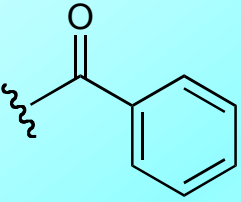
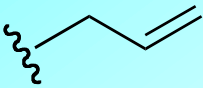
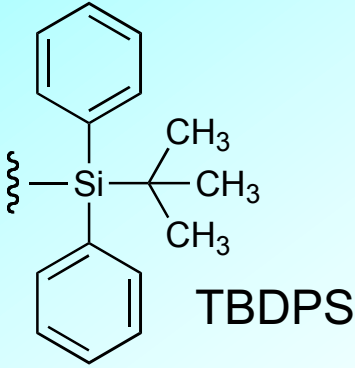
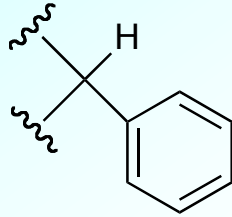
O-Glycosylation Reaction Mechanism



グリコシル化の位置選択性を制御するには

保護基をつかう！！

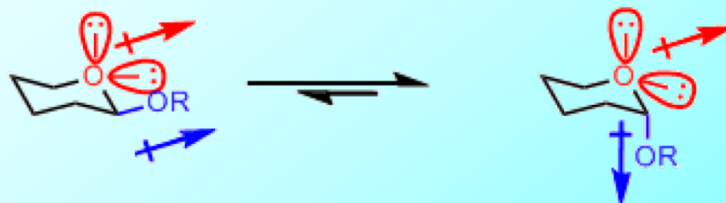


Acyl-Type	Ether-Type	Silyl Ether	Cyclic Acetal
 <p>Ac</p>	 <p>Bn</p>	 <p>TBDMS</p>	 <p>isopropylidene</p>
 <p>Bz</p>	 <p>All</p>	 <p>TBDPS</p>	 <p>benzylidene</p>

グリコシル化の立体選択制を制御するには

糖供与体	優先するグリコシドの立体		立体の制御
	アノマー効果	隣接基関与	
D-Glc D-Gal D-GlcNAc D-GalNAc	α	β	可能
D-Man	α	α	困難
L-Fuc	α	β	可能
NeuAc	β	なし	困難

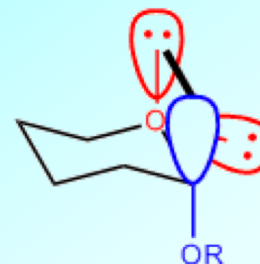
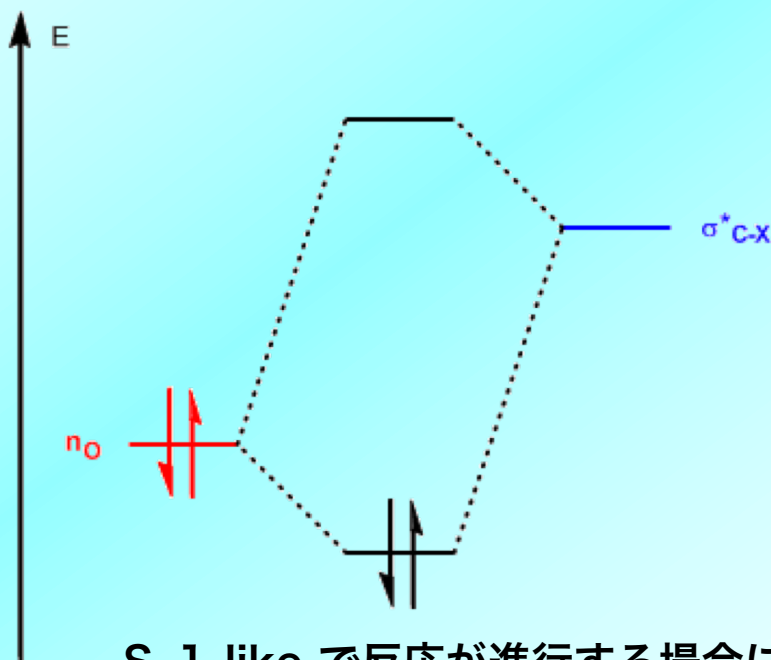
Dipole Minimization



溶媒は非配位性

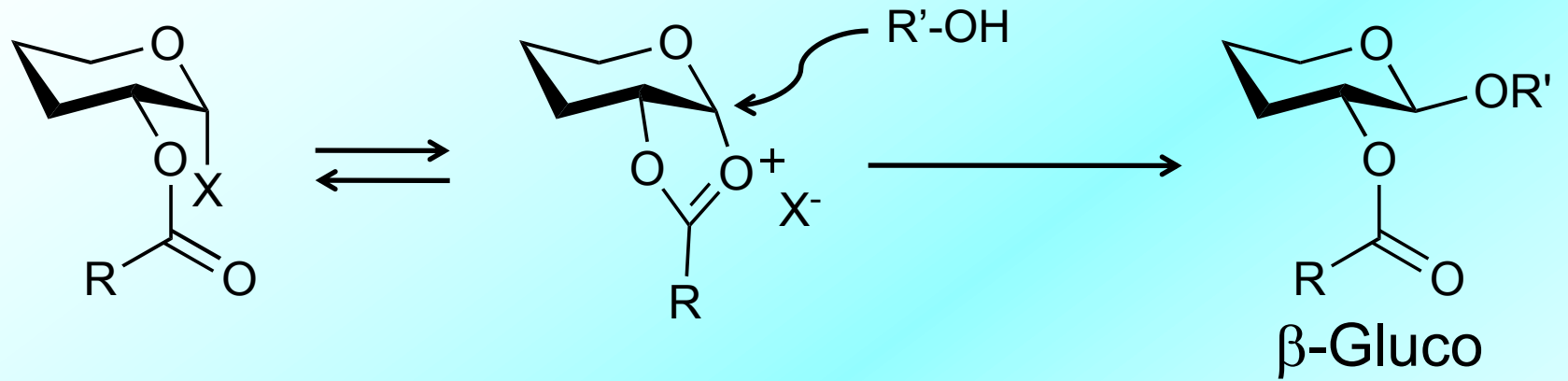
高温（室温～50 °C程度）で
ゆっくり反応させると良い

Electron Delocalization

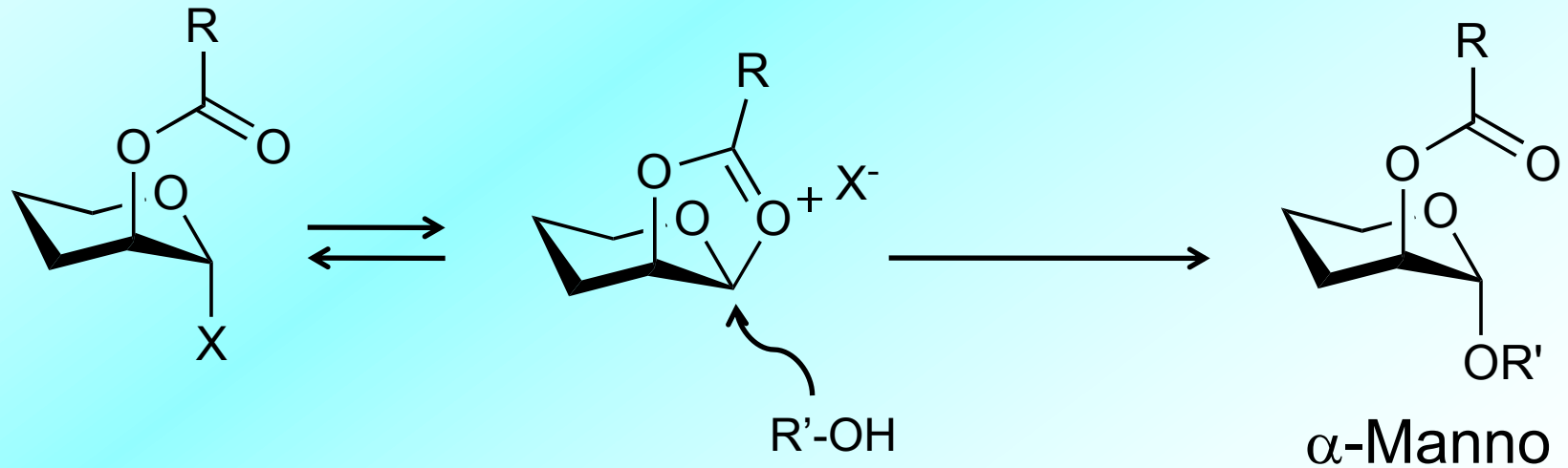


2位の保護基は
非アシル系

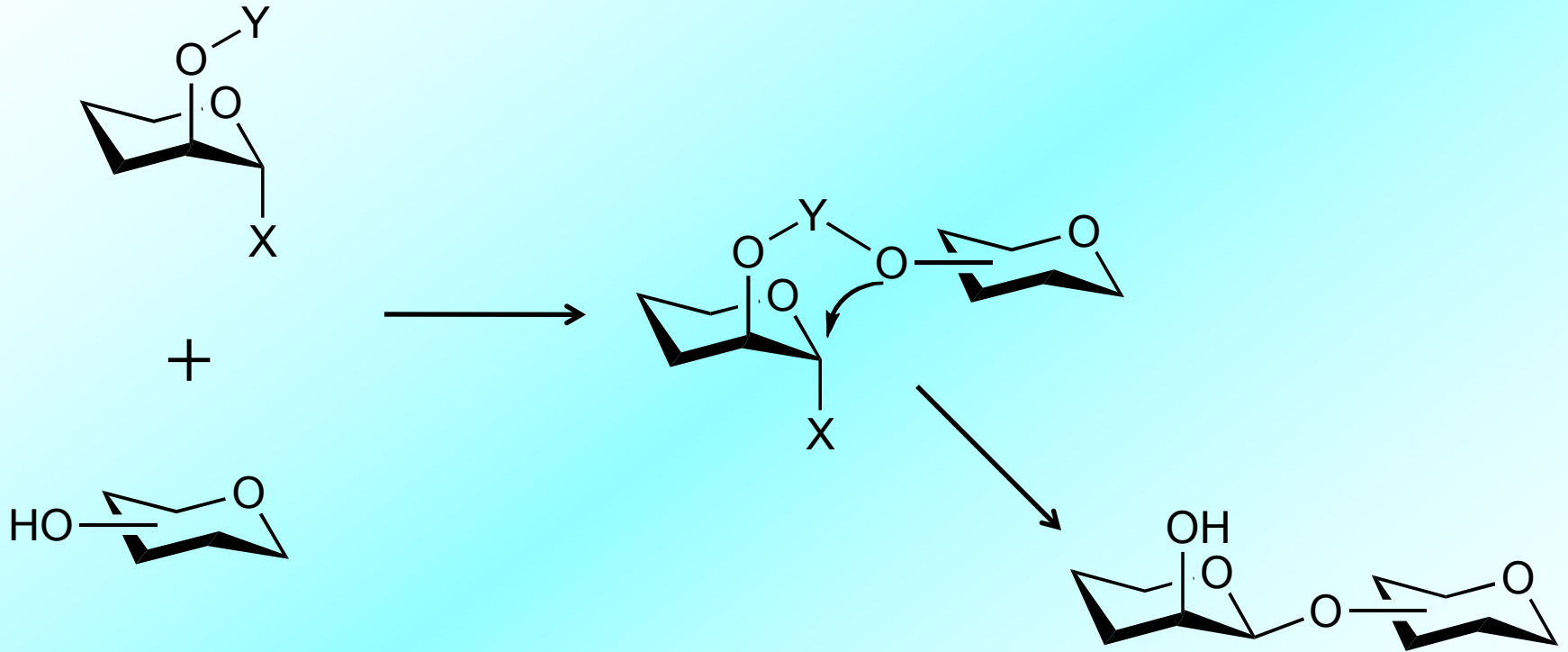
S_N1 -like で反応が進行する場合に有効。反応条件の調節により効果的。



Promoter

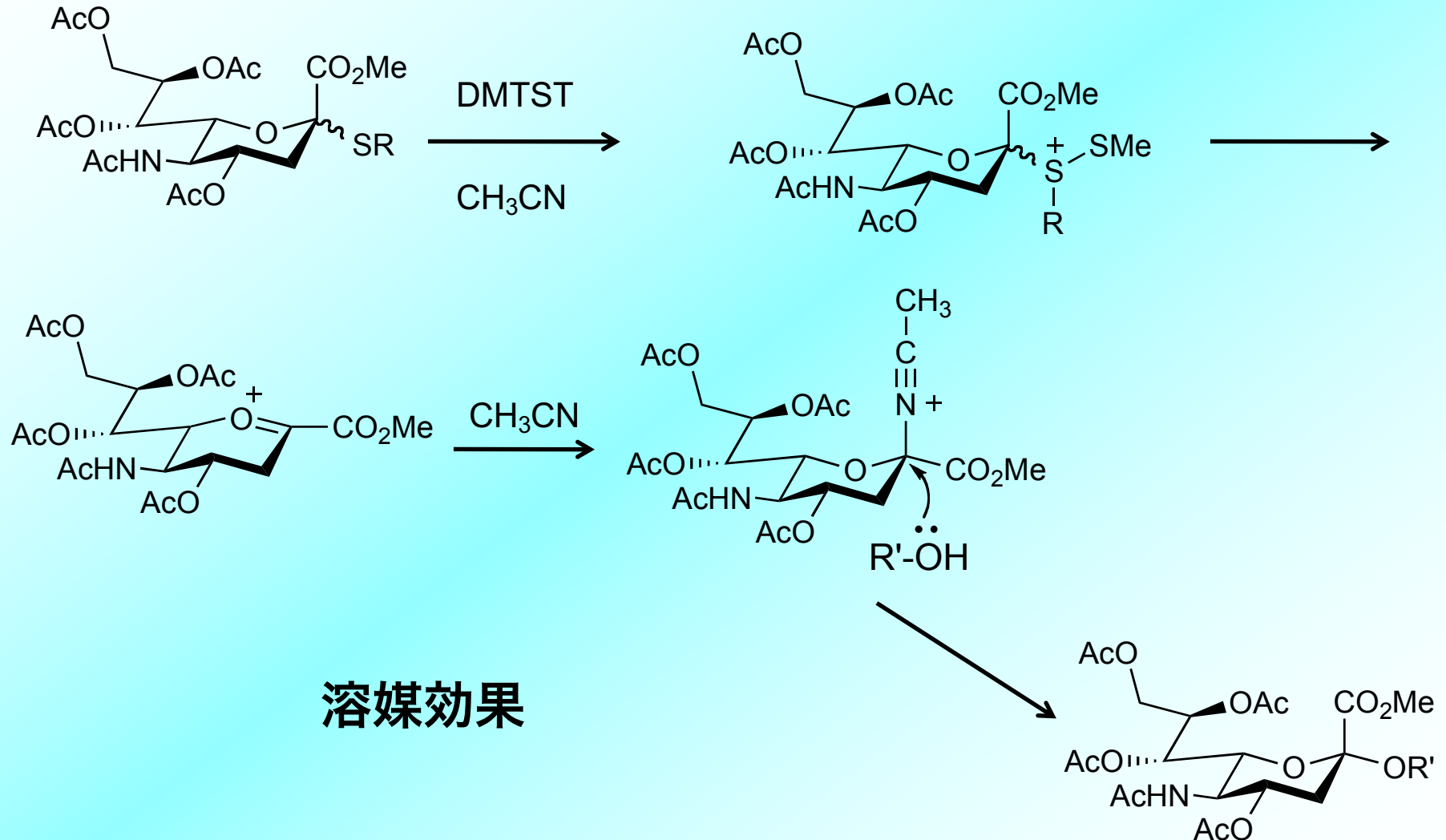


生成困難な β -マンノシド結合を形成するには

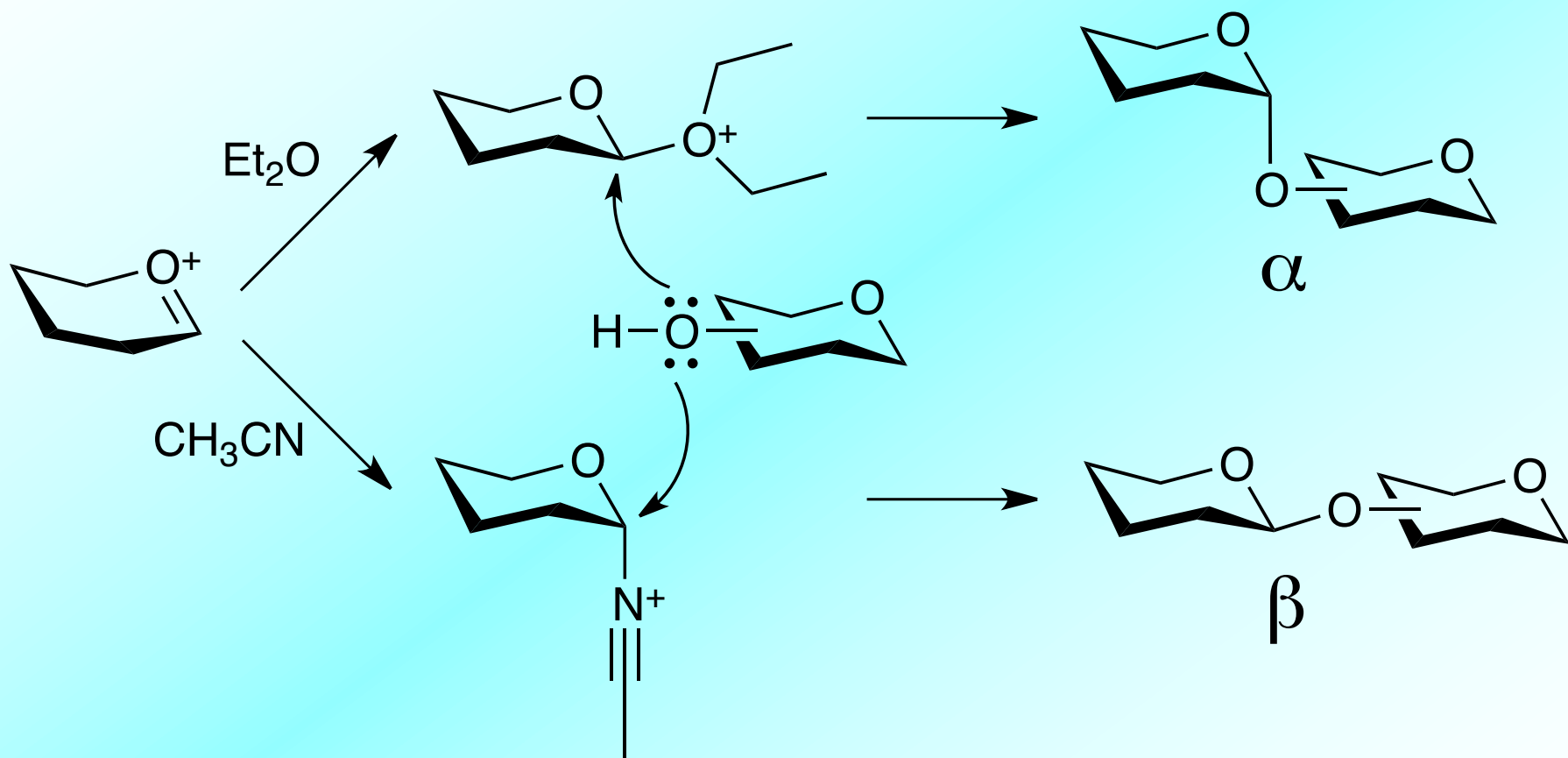


分子内アグリコン転移法

生成困難な α -シアロシド結合を形成するには

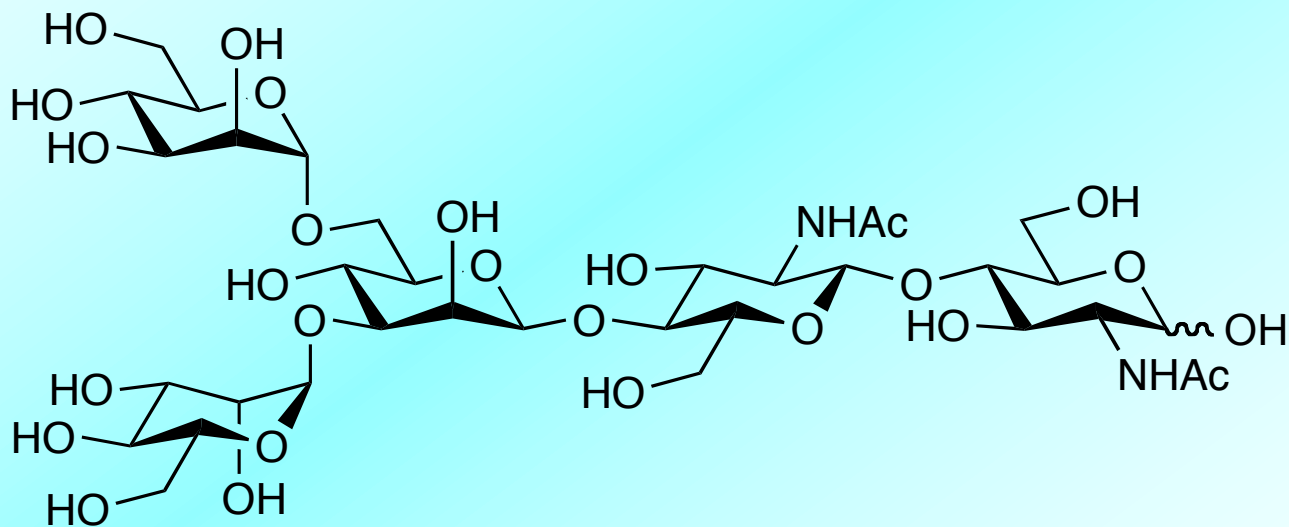


溶媒効果による立体選択的なグリコシル化



実例～高マンノース型コア5糖の合成～

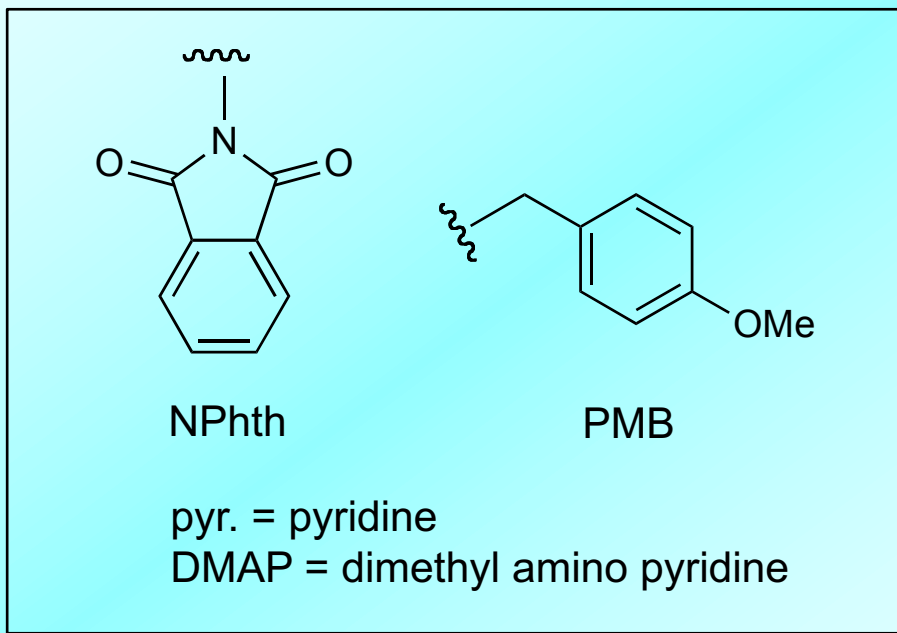
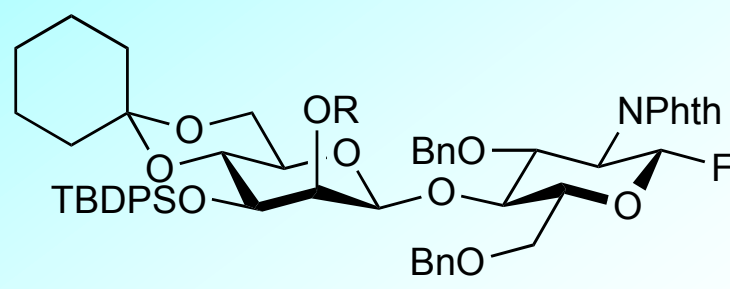
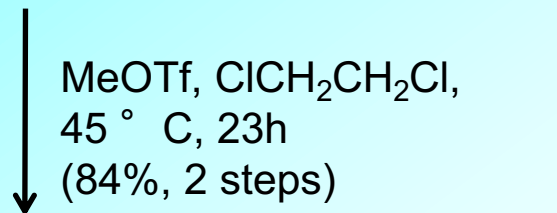
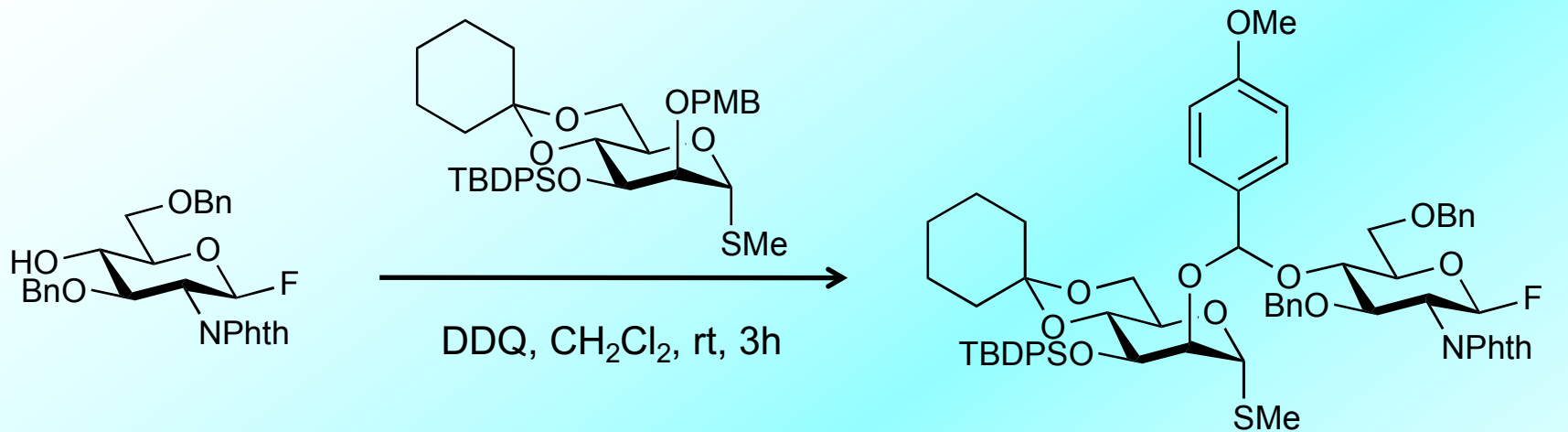
Totani, K.; Matsuo, I.; Ito, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 2285.



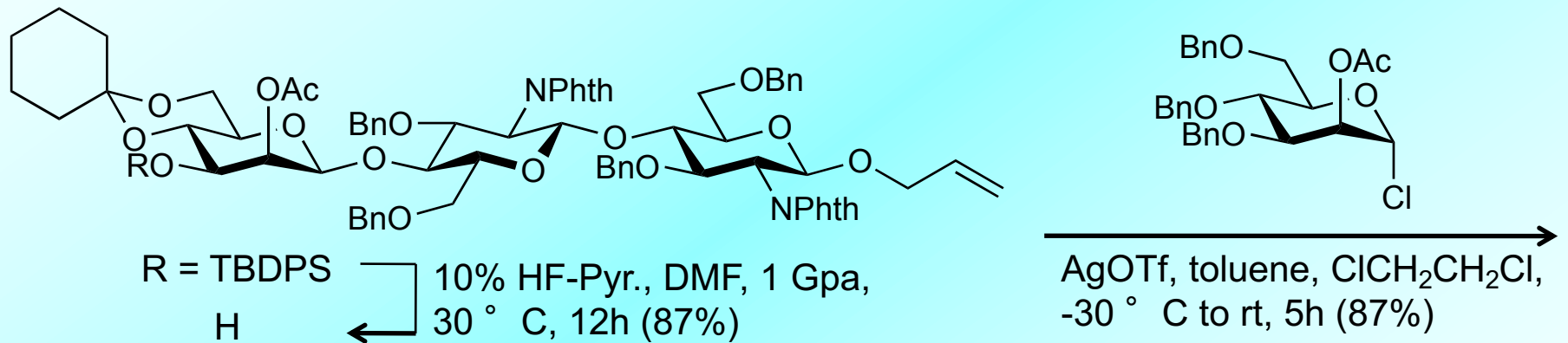
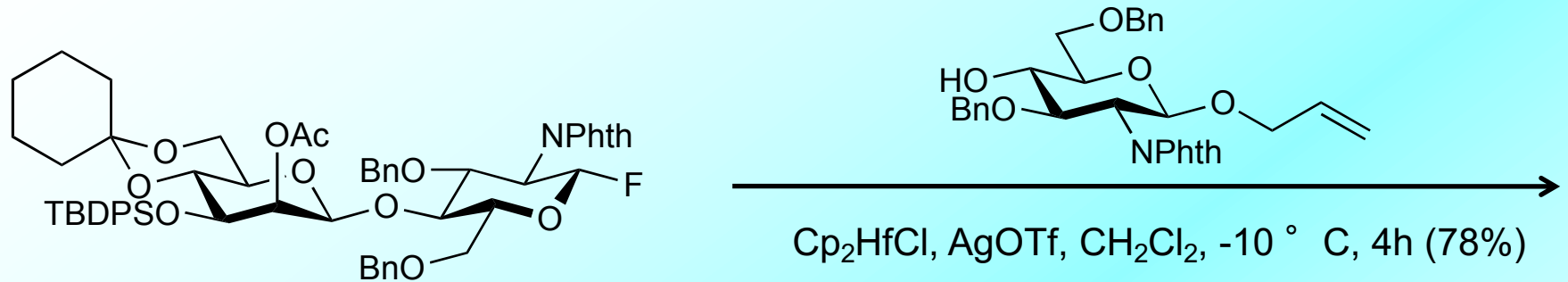
Chemical Formula: $C_{34}H_{58}N_2O_{26}$

Molecular Weight: 910.82

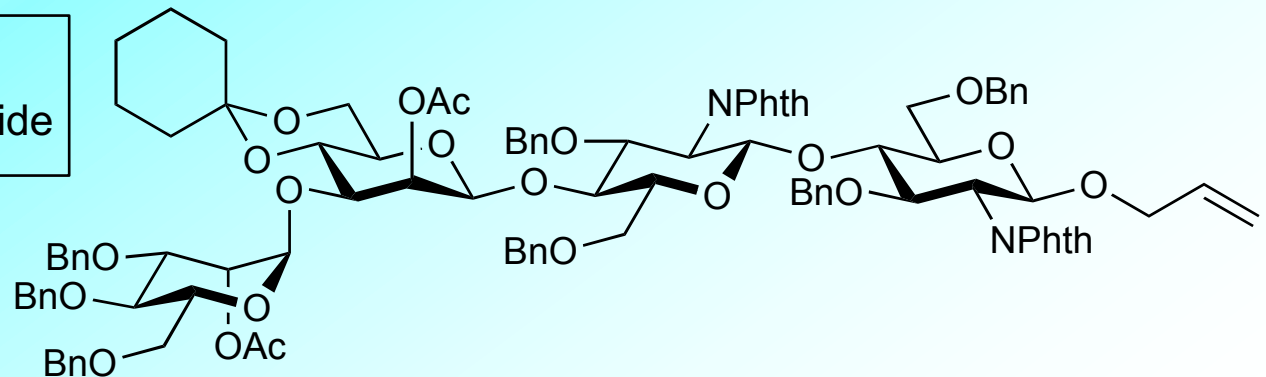
コア5糖の合成～その1～



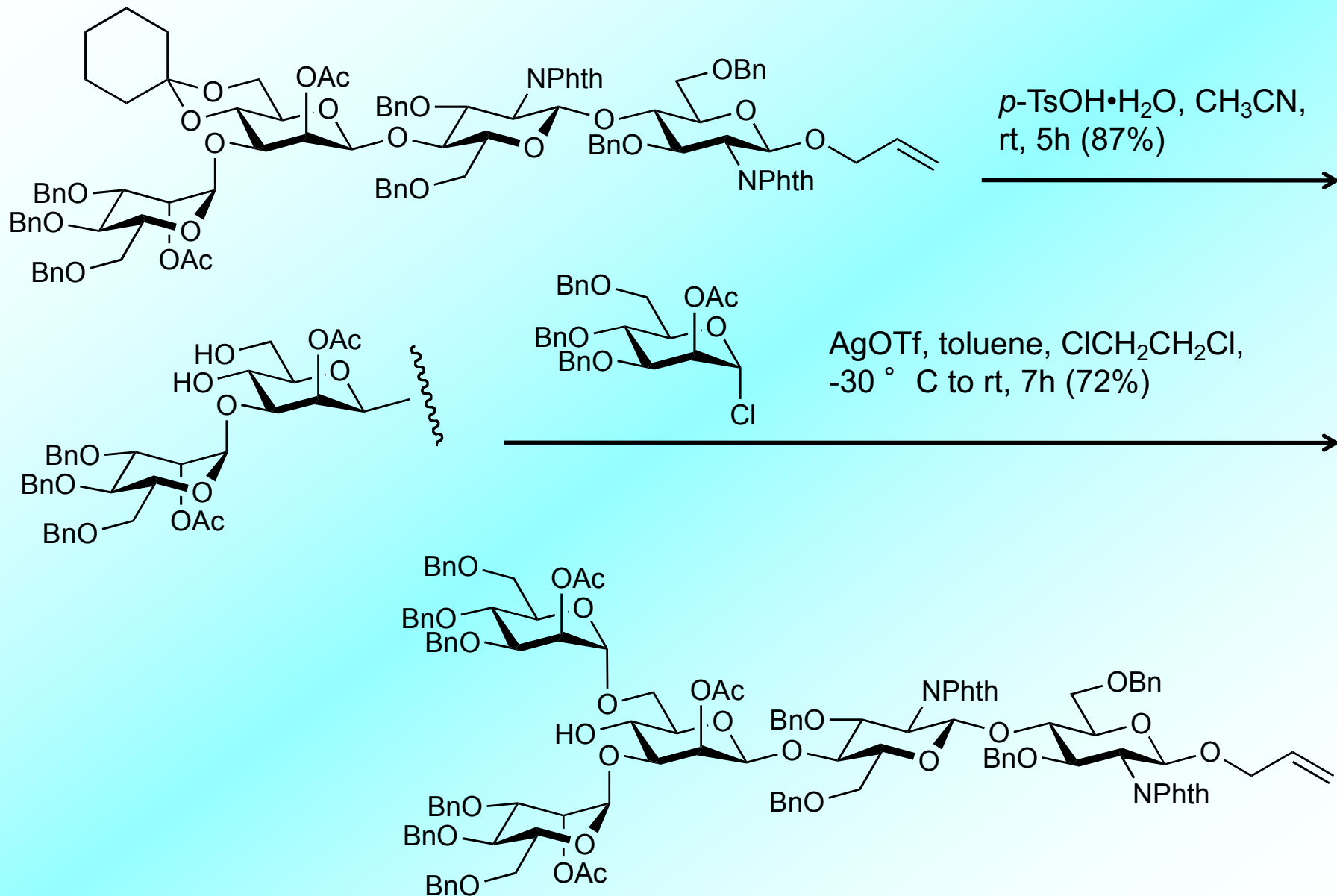
コア5糖の合成～その2～



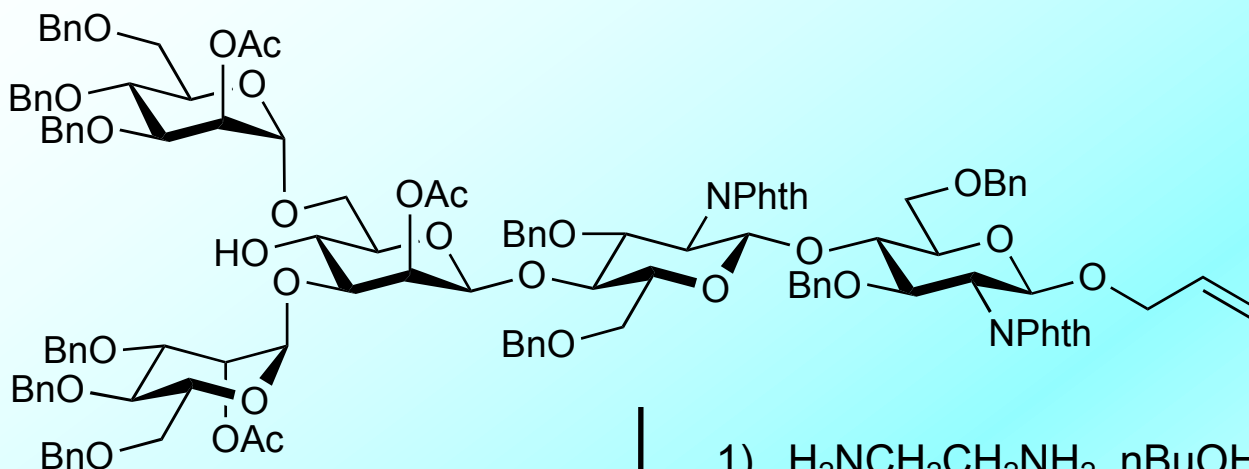
Cp = cyclopentadieny
 DMF = N,N-dimethylformamide



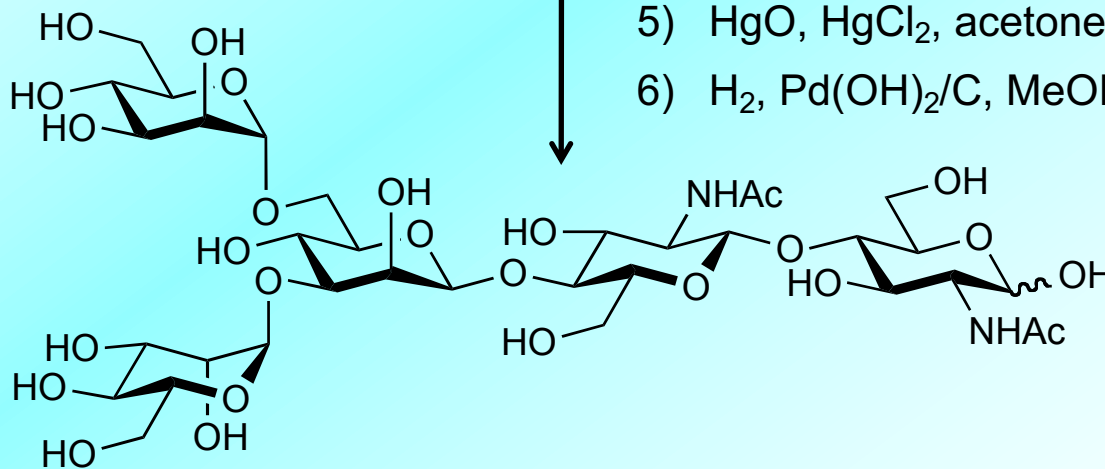
コア5糖の合成～その3～



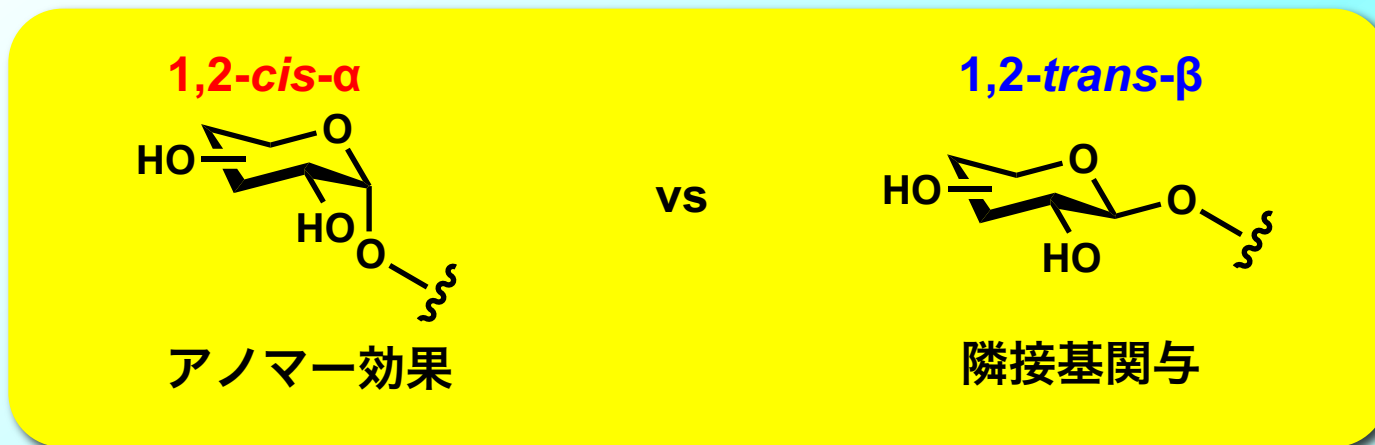
コア5糖の合成～その4～



- 1) $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, nBuOH, 80 ° C, 18h
- 2) Ac_2O , pyr., DMAP, rt, 2.5h
- 3) 1M NaOMe, MeOH, rt, 3.5h (89%, 3 steps)
- 4) $[\text{Ir}(\text{COD})(\text{PMePh}_2)_2]\text{PF}_6$, H_2 , THF, rt, 2h
- 5) HgO, HgCl₂, acetone-H₂O (10:1), rt, 5h
- 6) H_2 , Pd(OH)₂/C, MeOH, rt, 2.5 h (85%, 3 steps)



1,2-cis- α -グリコシド形成にアノマー効果は強力ではない？



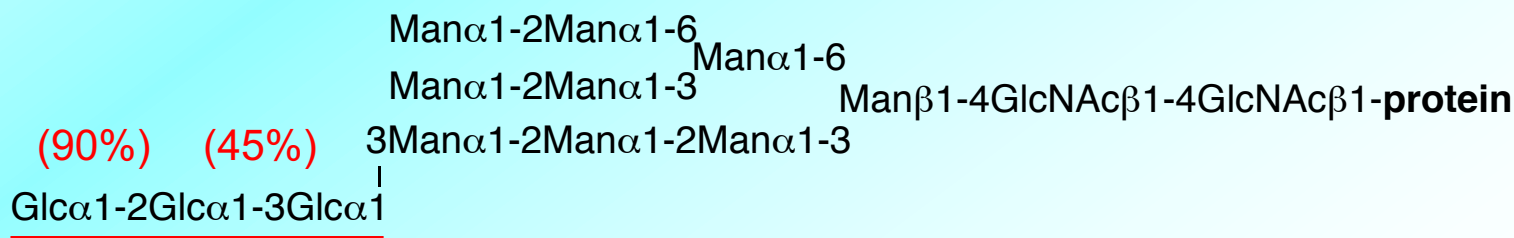
☒ 溶媒効果

収率： 0 ~ 100%
 α/β : 1:1 ~ 20:1

A. Ishiwata and Y. Ito *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 3521.

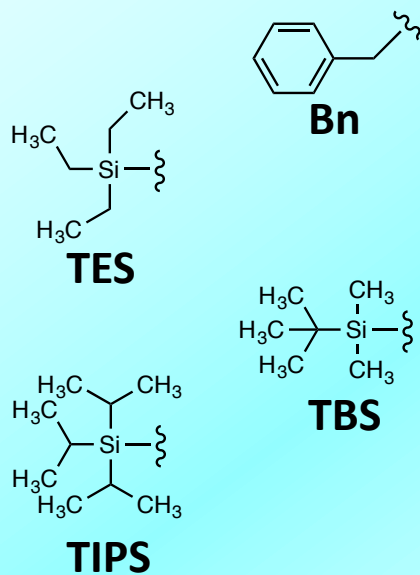
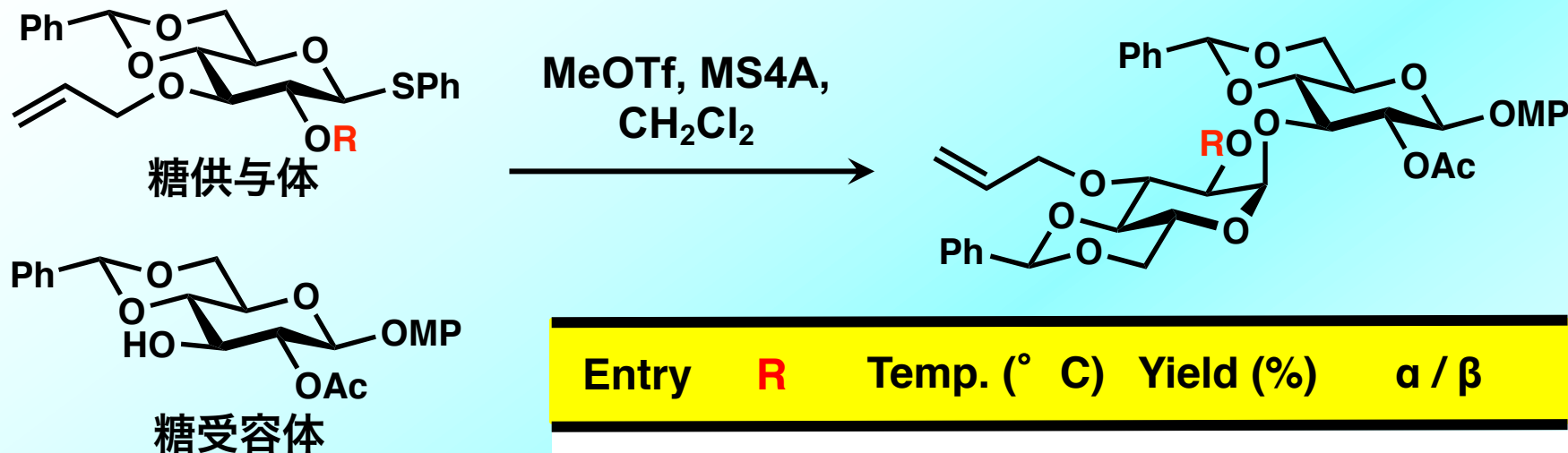
☒ 高マンノース糖鎖合成

I. Matsuo, K. Totani, A. Tatami and Y. Ito *Tetrahedron* **2006**, 62, 8262.



立体電子効果を用いた1,2-cis- α -グリコシド形成反応の開発

K. Totani et al. RSC Advances 2015, 5, 75918.

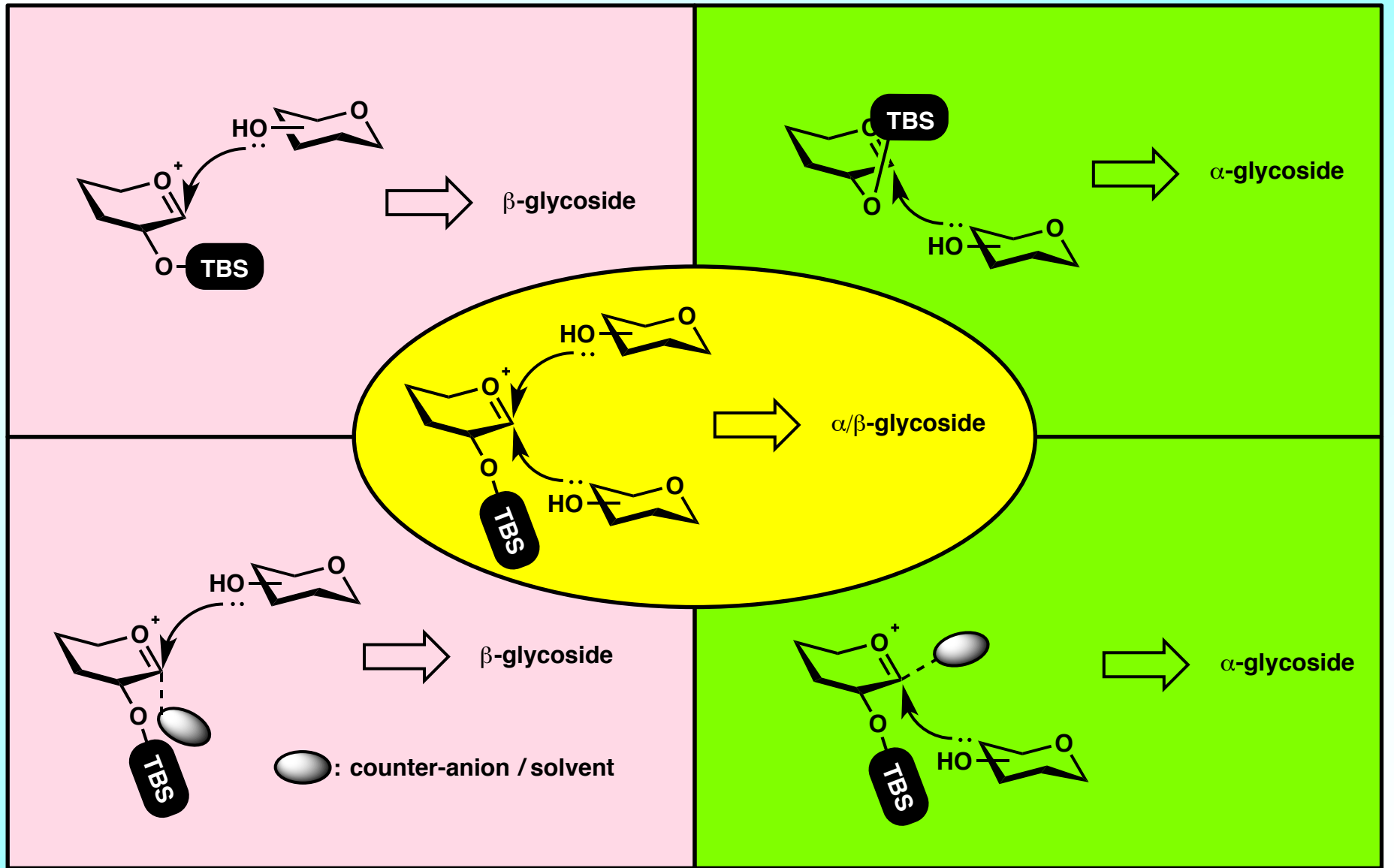


Entry	R	Temp. (° C)	Yield (%)	α / β
1	Bn	10	85	82 : 18
2	TES	0	-	-
3	TBS	0	96	>95 : 5
4	TIPS	0	50	>95 : 5

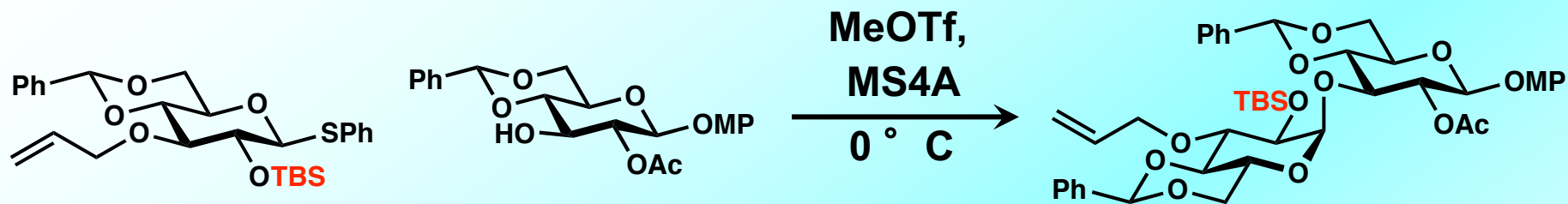
☒ TBS基は高い収率と α -選択性に効果的

☒ TBS 効果 : 立体的効果 / 電子的効果?

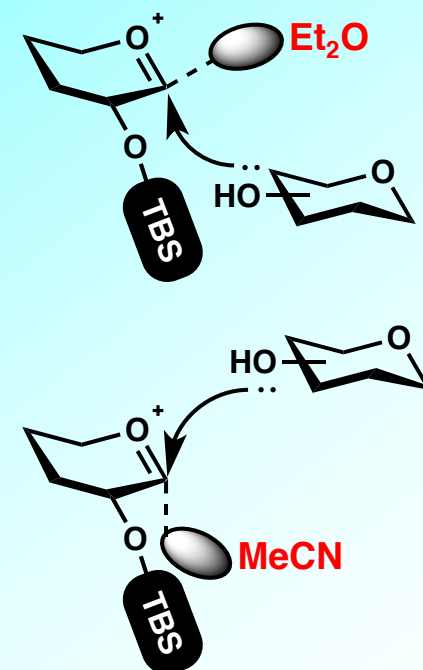
可能な立体制御モード



溶媒効果を基にした立体制御モードの絞り込み

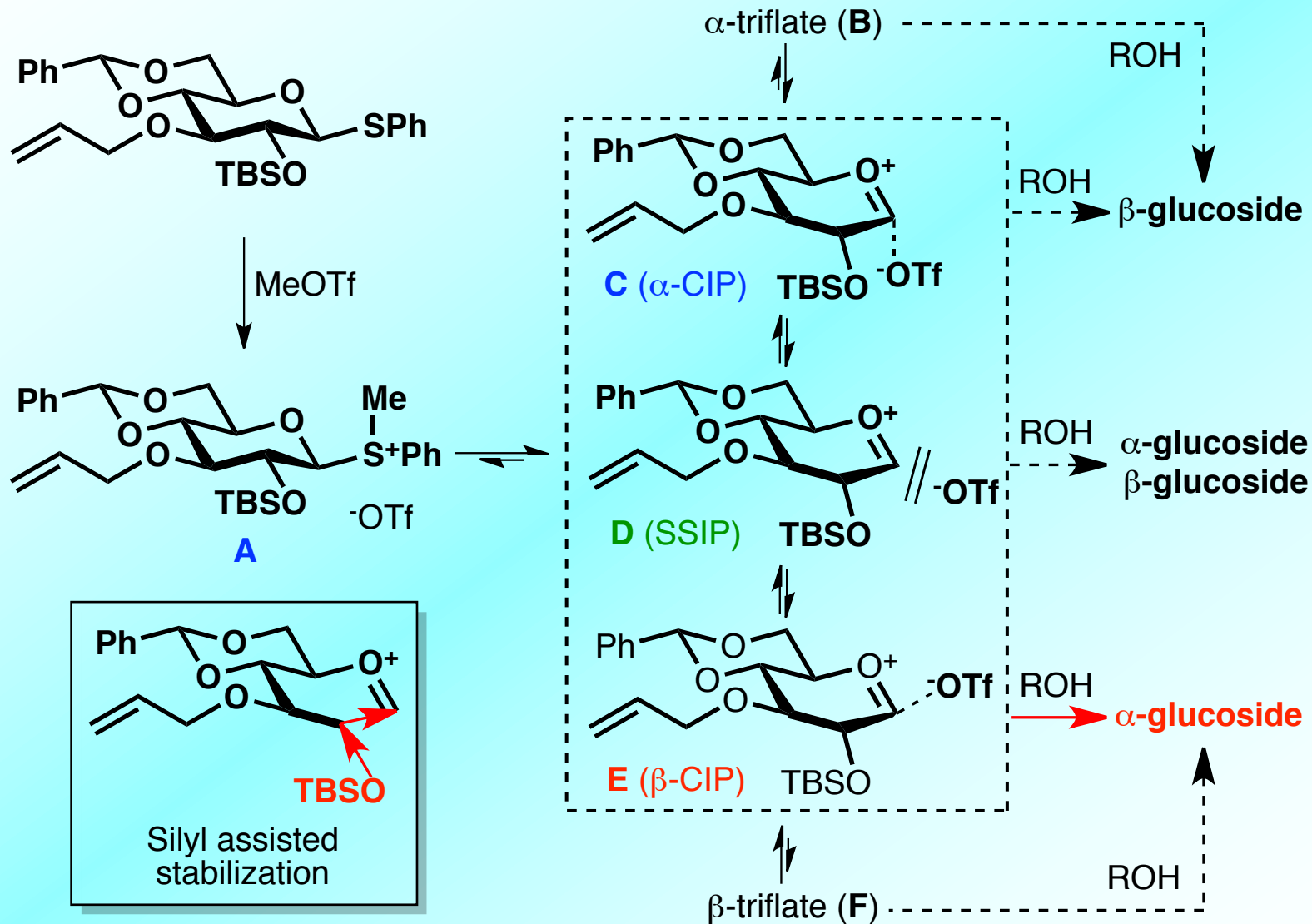


Entry	Solvent	Participation	Yield (%)	α / β
1	CH ₂ Cl ₂	None	96	>95 : 5
2	Toluene	None	41	>95 : 5
3	Et ₂ O	β	20	>95 : 5
4	MeCN	α	21	48 : 52



☒ TBS基の立体的なかさ高さは、立体選択性に影響を与えない

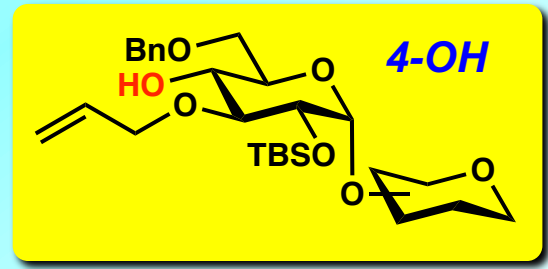
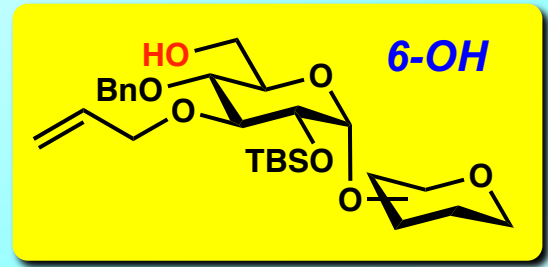
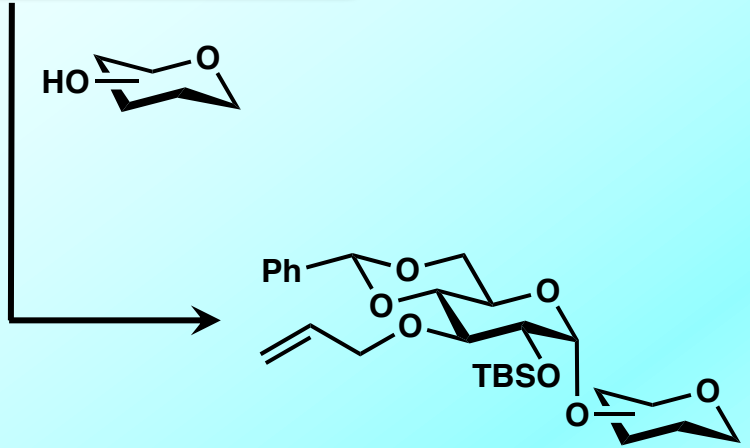
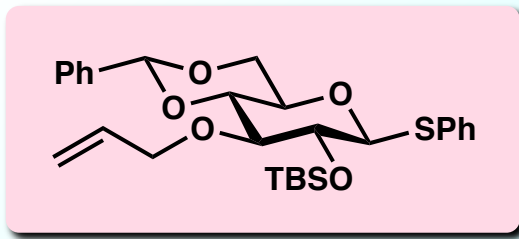
α -グルコシル化の立体制御機構



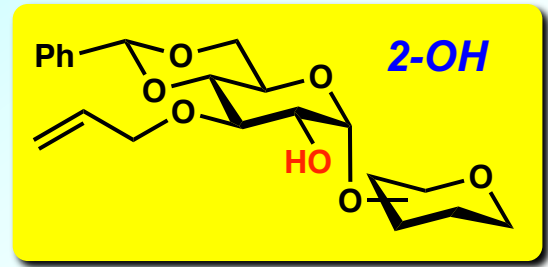
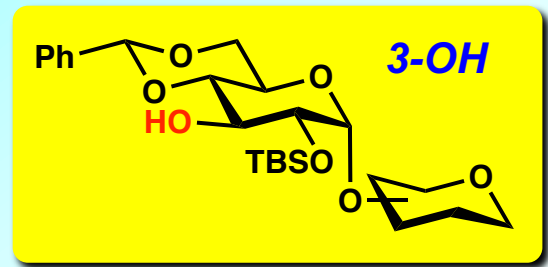
糖受容体に対する一般性

Entry	Donor	Acceptor	Yield (%)	α / β
1			96	>95 : 5
2	↓		77	93 : 7
3			43	92 : 8
4		<i>Disarmed</i>	82	>95 : 5
5		<i>Armed</i>	96	>95 : 5

提唱するグルコシルドナーの実用性



位置選択的な脱保護

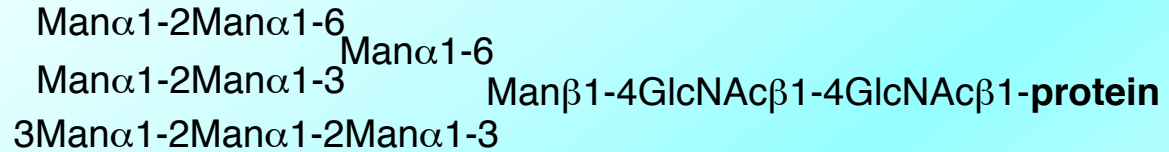


☒ 全ての位置に対して更なるグリコシル化が可能

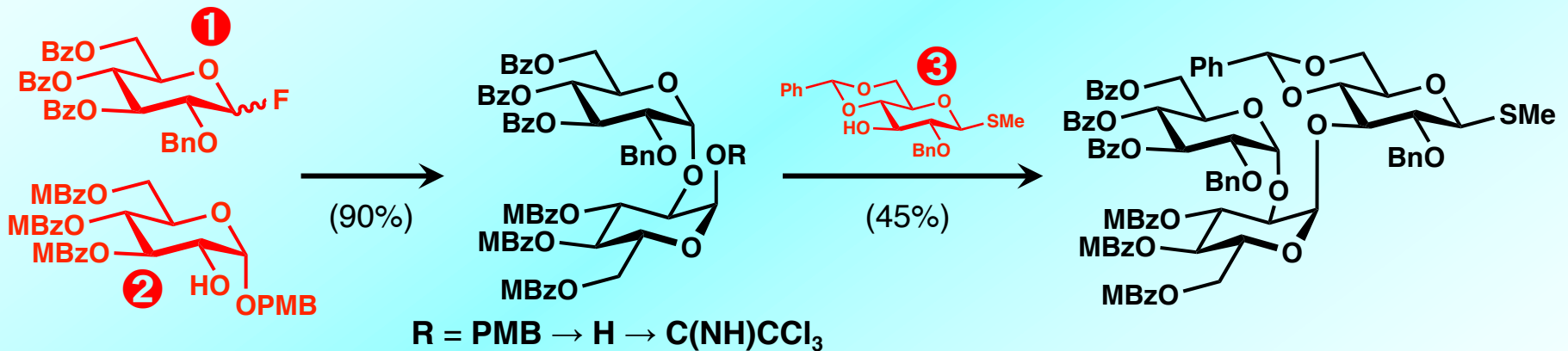
☒ 本糖供与体はオリゴ糖合成に効果的

3糖合成 (既存のアプローチ)

1,2-*cis*- α -linkage

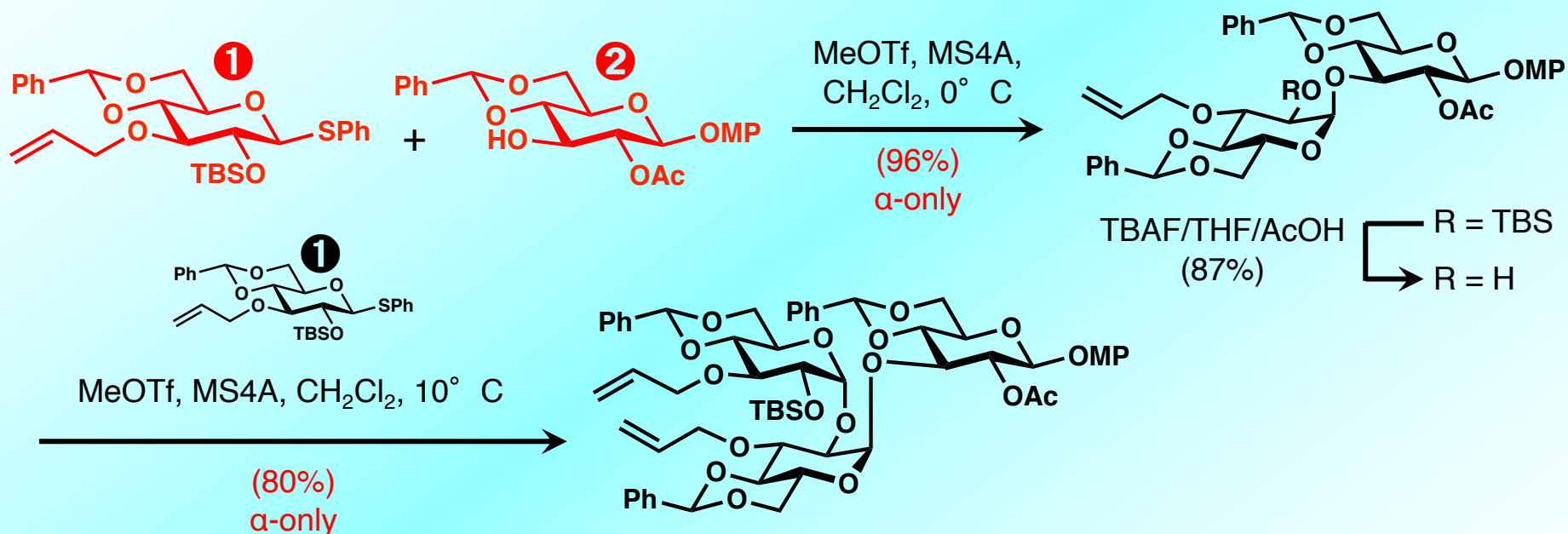
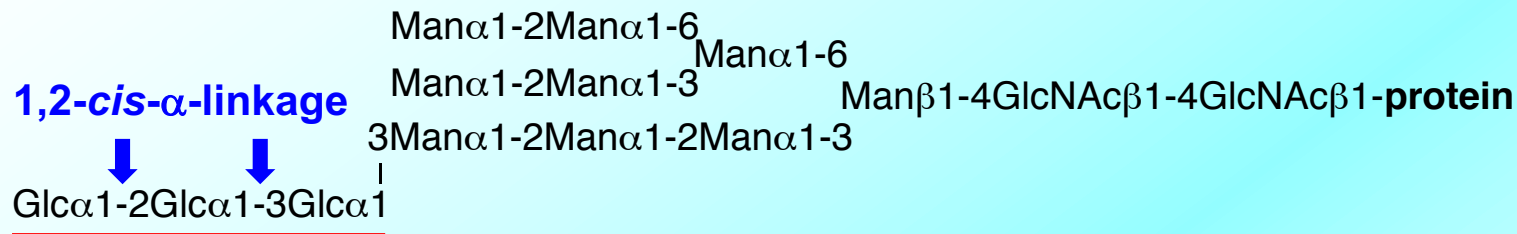


I. Matsuo, K. Totani, A. Tatami and Y. Ito *Tetrahedron* **2006**, 62, 8262.



- ✘ 3種類の単糖ユニットが必要
- ✘ 標的3糖への変換に4工程を要する
- ✘ 第二段階のグリコシル化が低収率

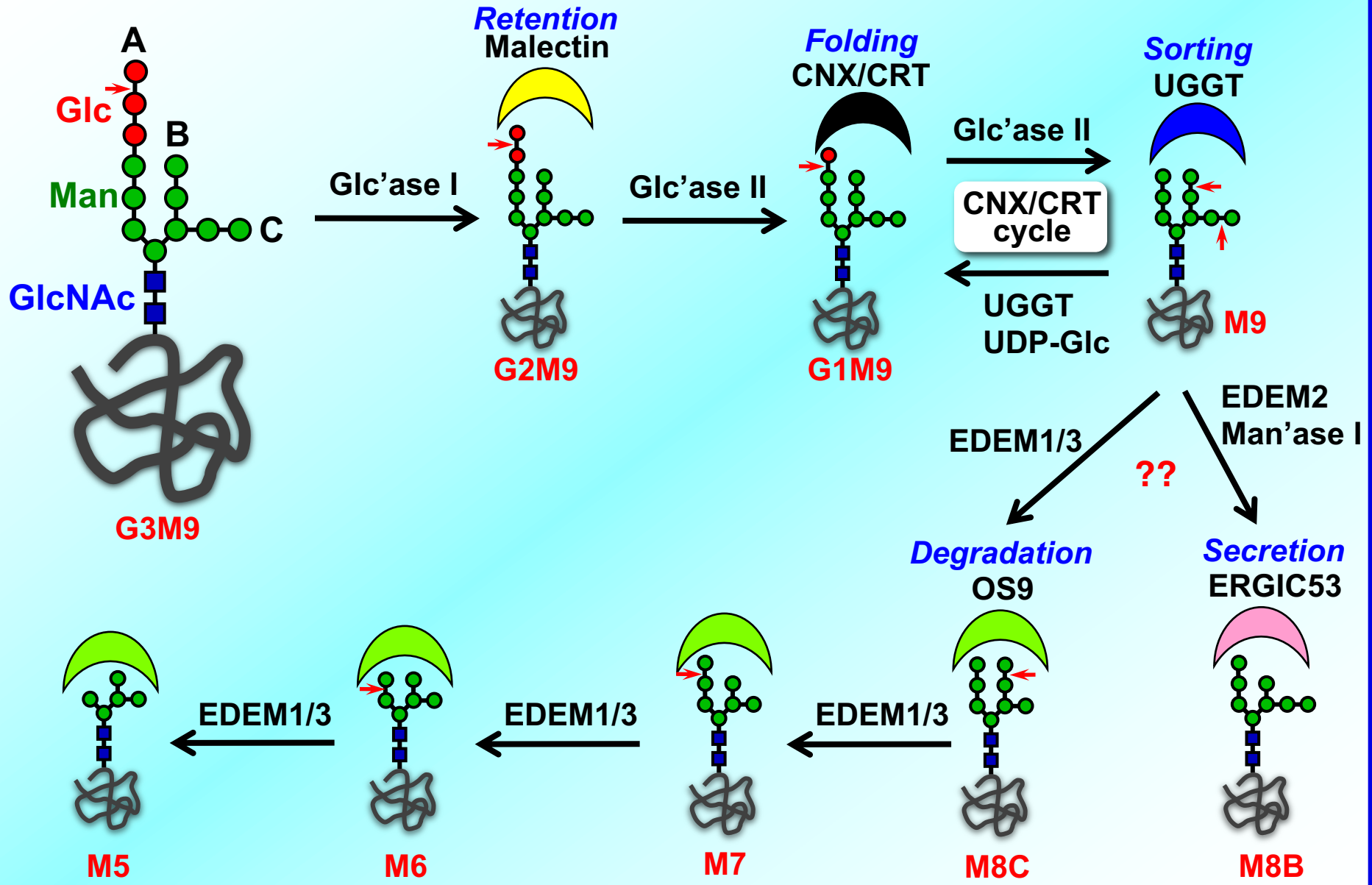
3糖合成 (提唱するアプローチ)

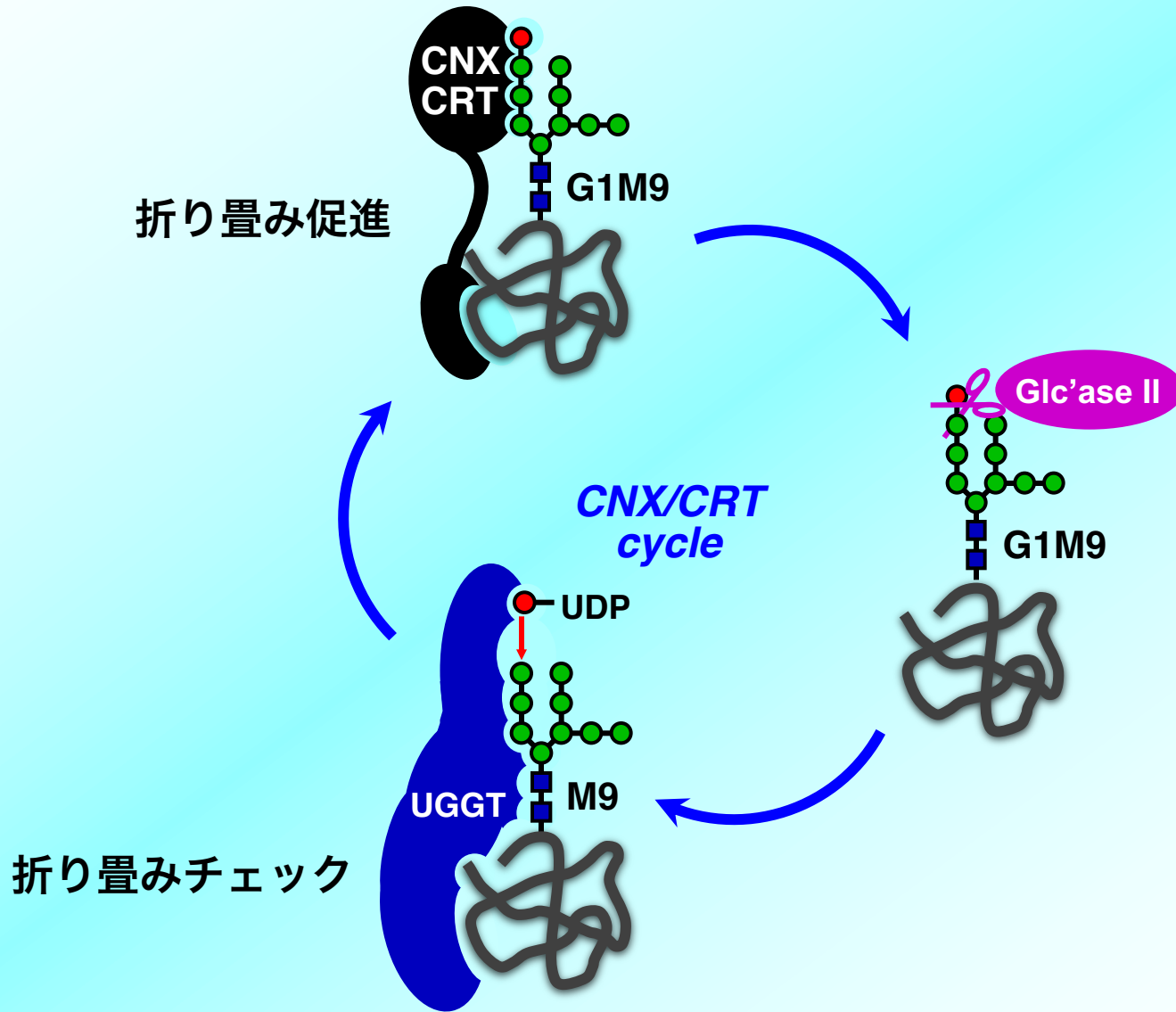


☒ 単糖ユニット数 (3 → 2)

☒ 合成工程数 (4 → 3)

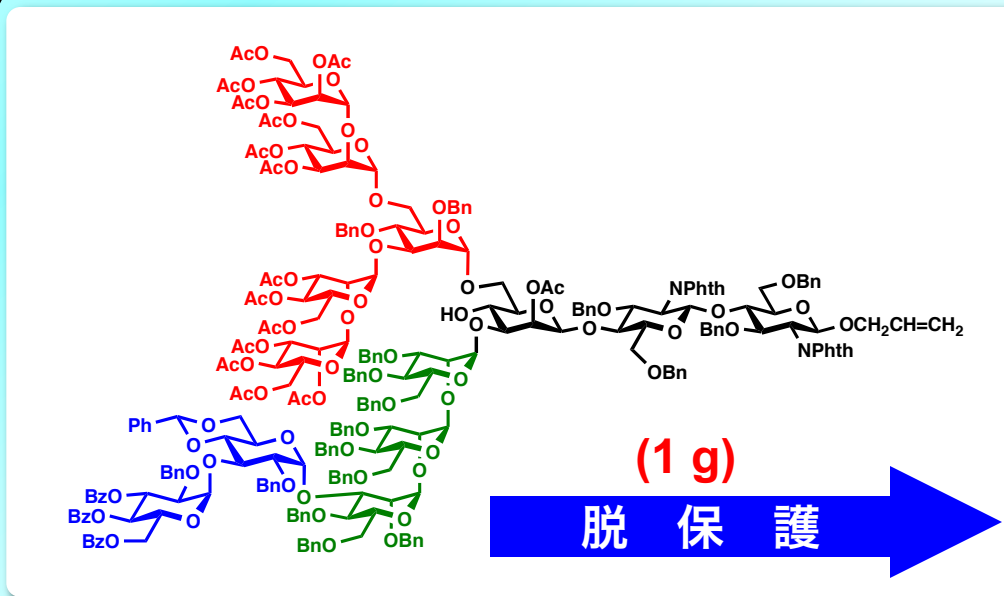
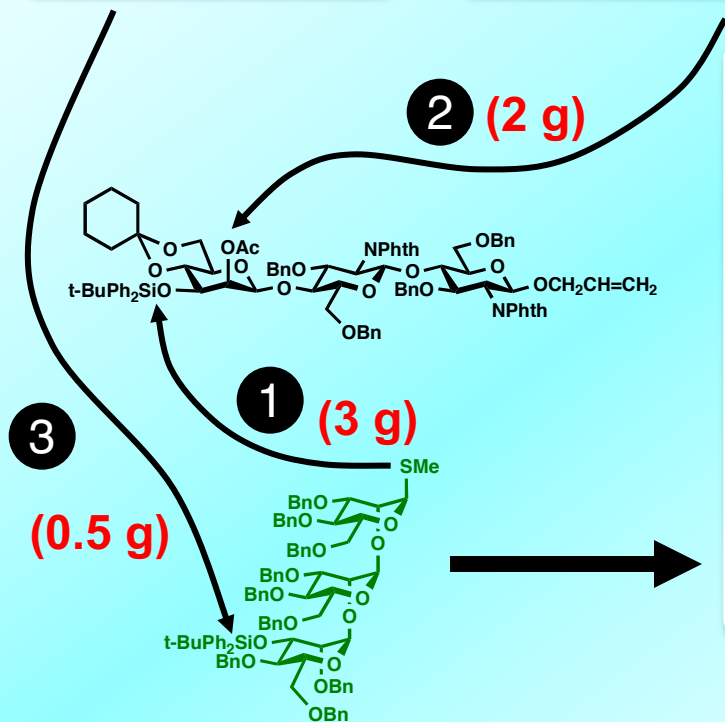
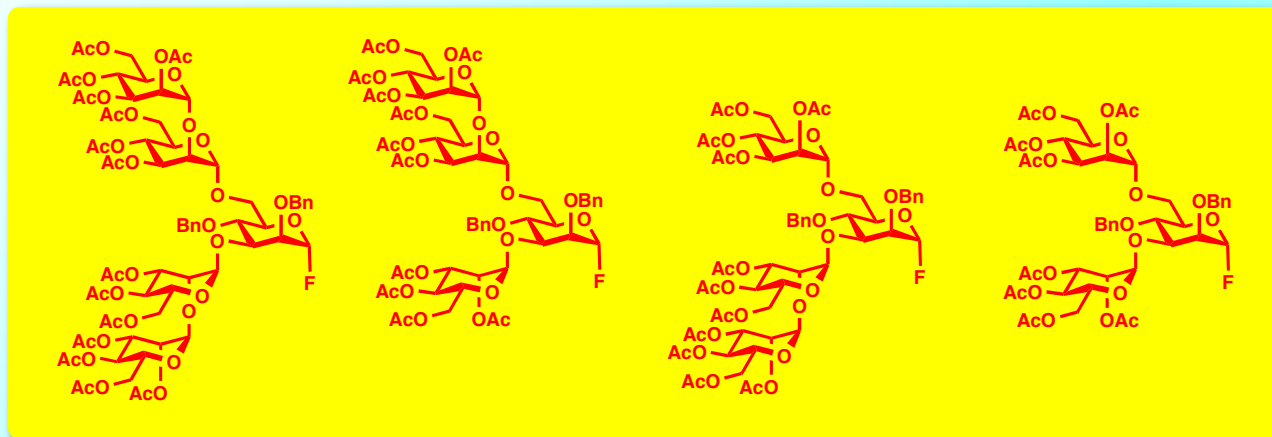
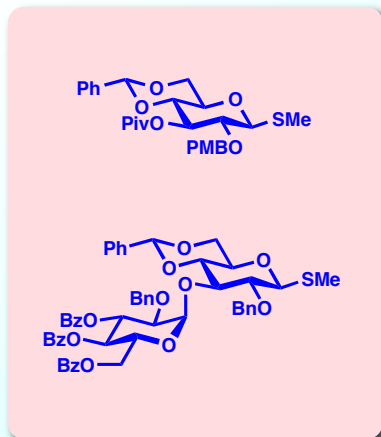
☒ 第二段階のグリコシル化収率 (低 → 高)





基質糖鎖の合成

I. Matsuo et al. *Tetrahedron* 2006, 62, 8262.

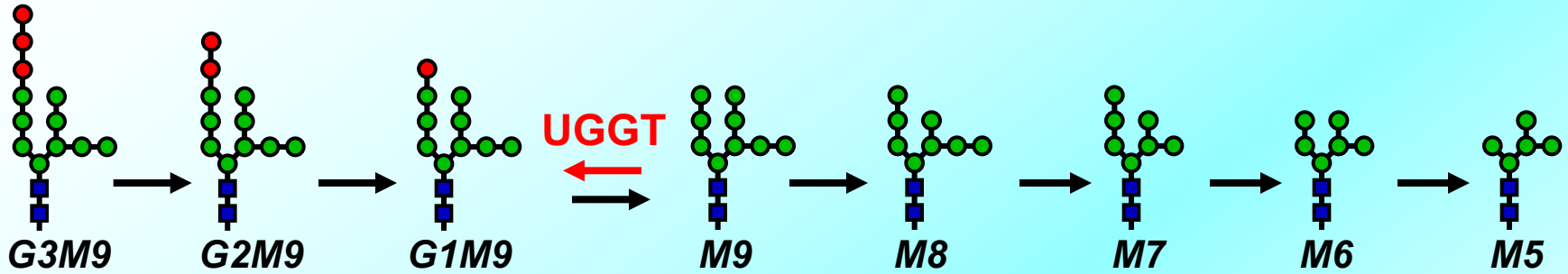


⊠ 大量合成に叶うルートを確認

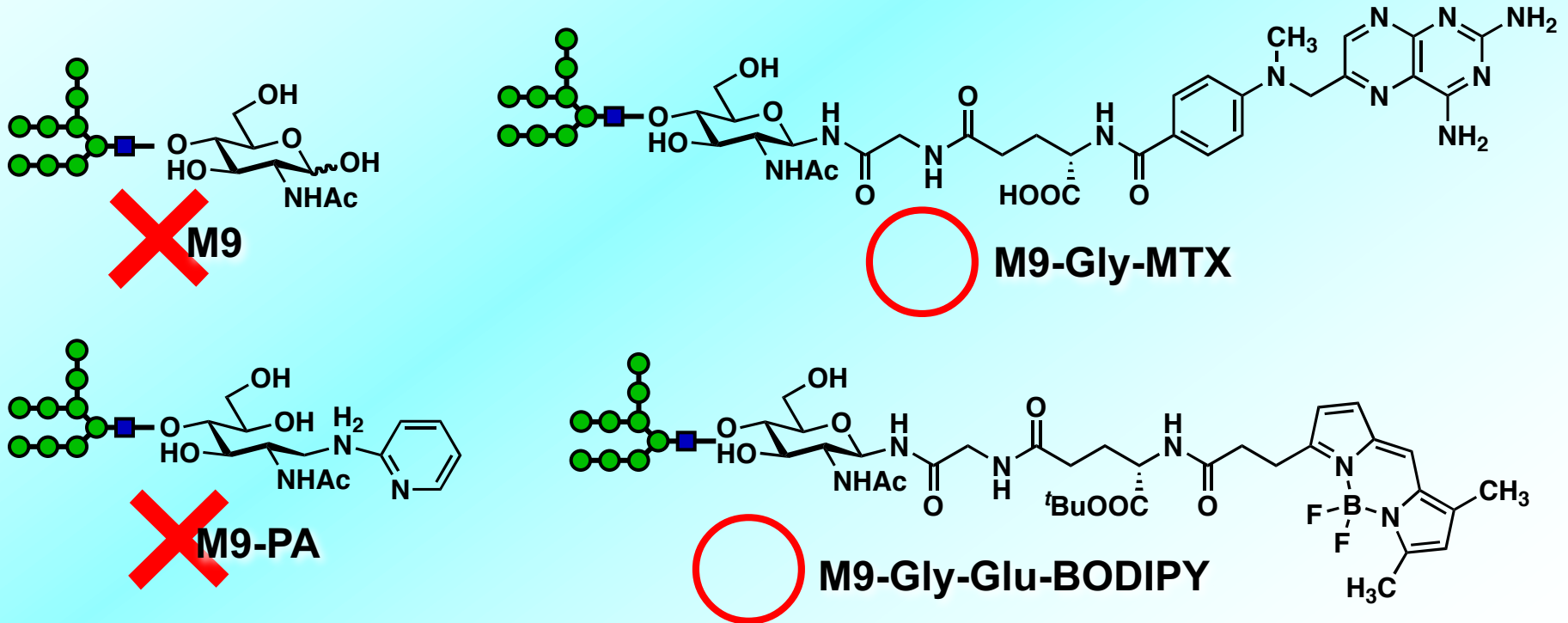
糖鎖プロセッシング解析に最適な基質は？

K. Totani et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005, 44, 7950.

K. Totani et al. *Biochemistry* 2009, 48, 2933.



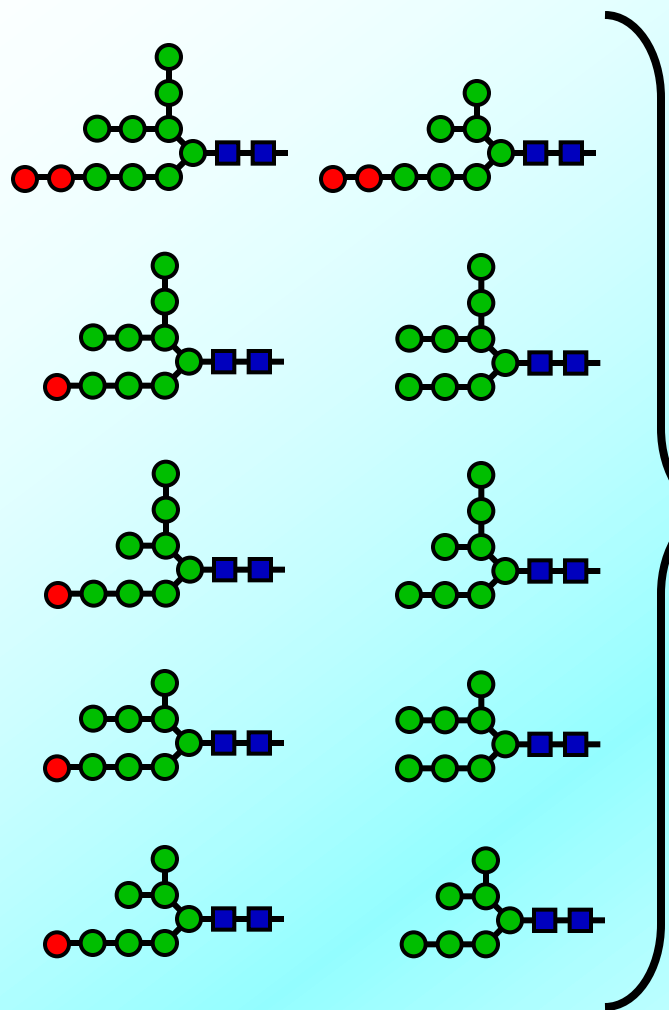
☒ **UGGT の基質認識にはモルテングロビュール様のアグリコンが必要**



合成基質の一例

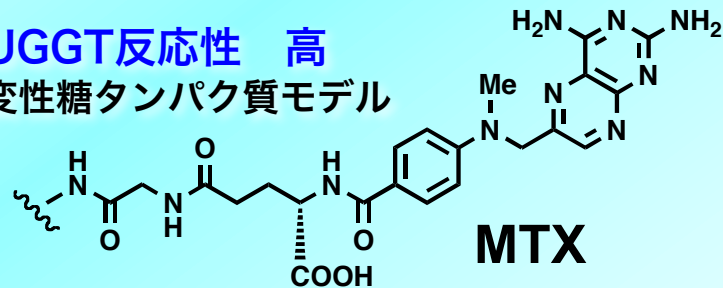
K. Totani et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005, 44, 7950.

K. Totani et al. *Bioorg. Med. Chem.* 2006, 14, 5220.



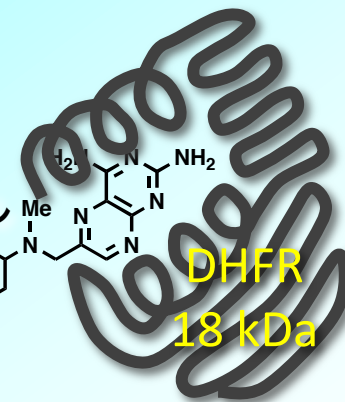
\sim OH UGGT反応性 なし

UGGT反応性 高
変性糖タンパク質モデル



MTX

UGGT反応性 低
成熟糖タンパク質モデル

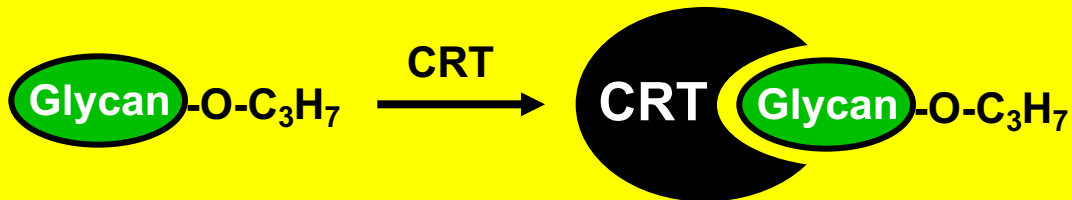


DHFR
18 kDa

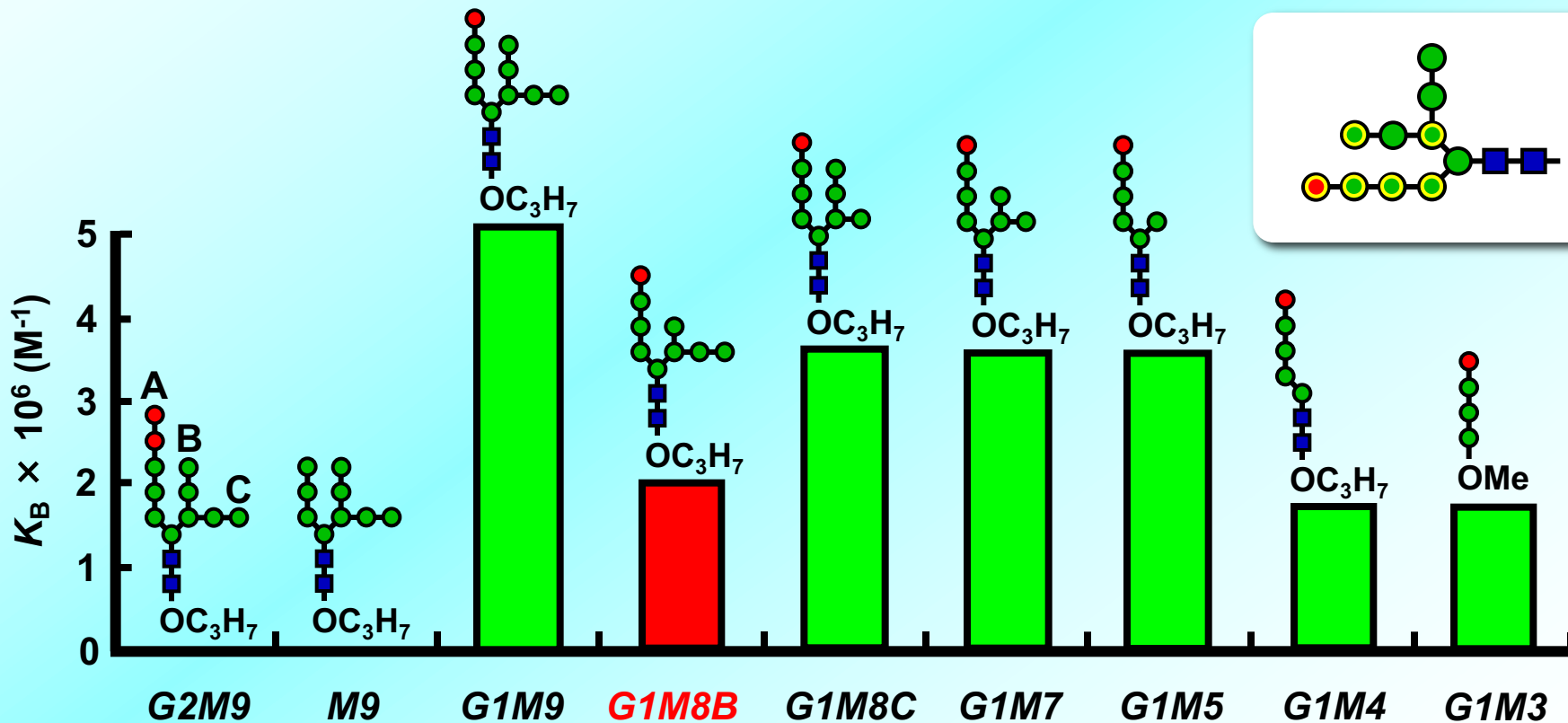
10 (糖鎖) × 3 (機能) = 30 種類の基質

CRT の糖鎖特異性

Y. Ito et al. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2005, 15, 481.



- ☒ *G1* 構造を特異的に認識
- ☒ *G1M8B* に特徴的な結合低下
- ☒ *B-, C-arm* の分岐 Man が重要

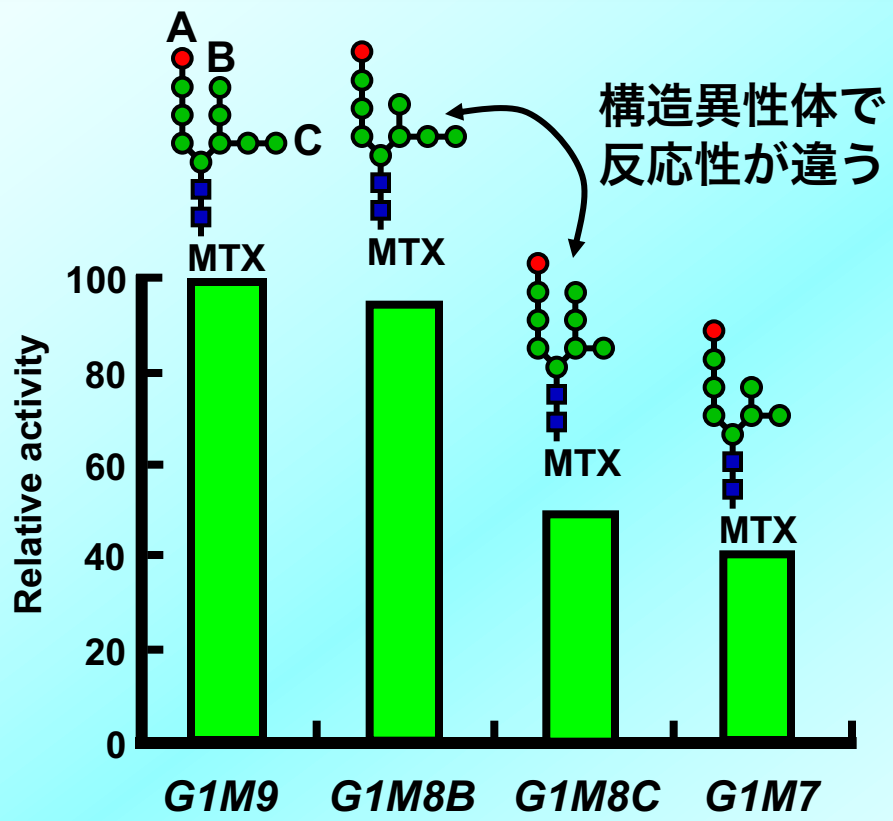


Glc'ase II の糖鎖特異性

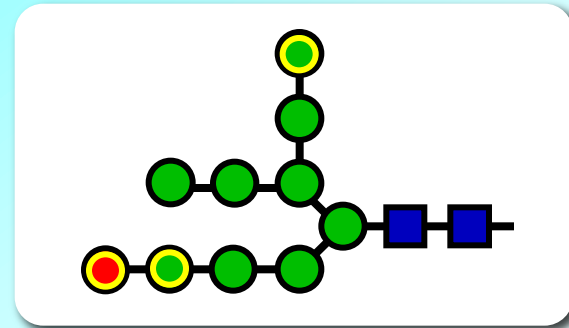
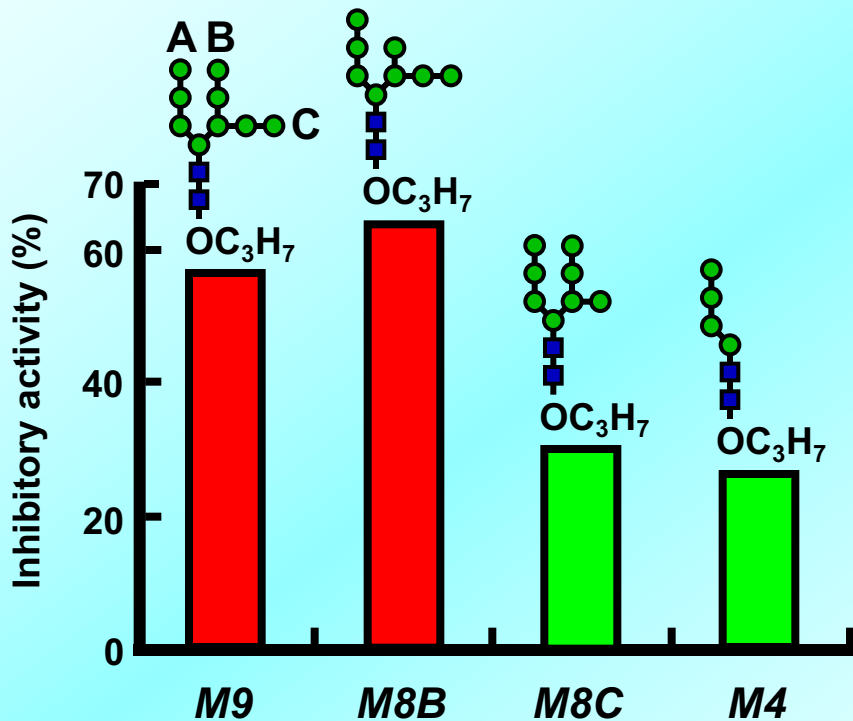
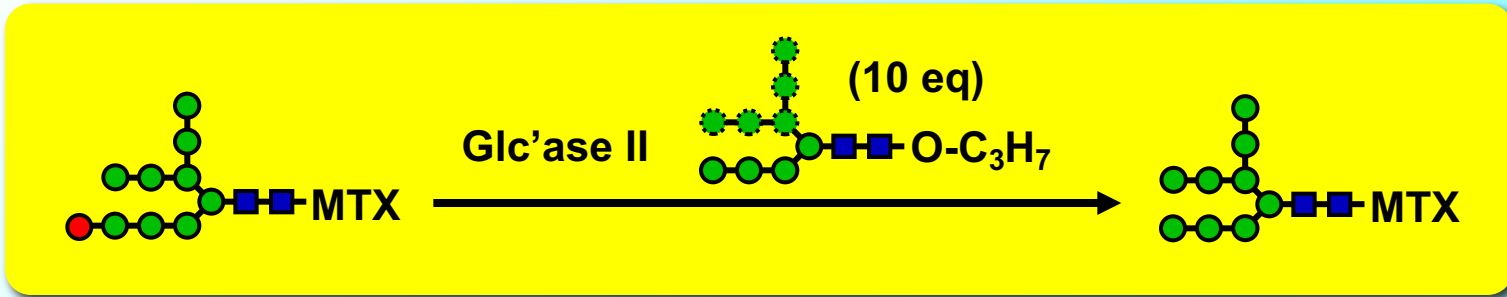
K. Totani et al. J. Biol. Chem. 2006, 281, 31502.



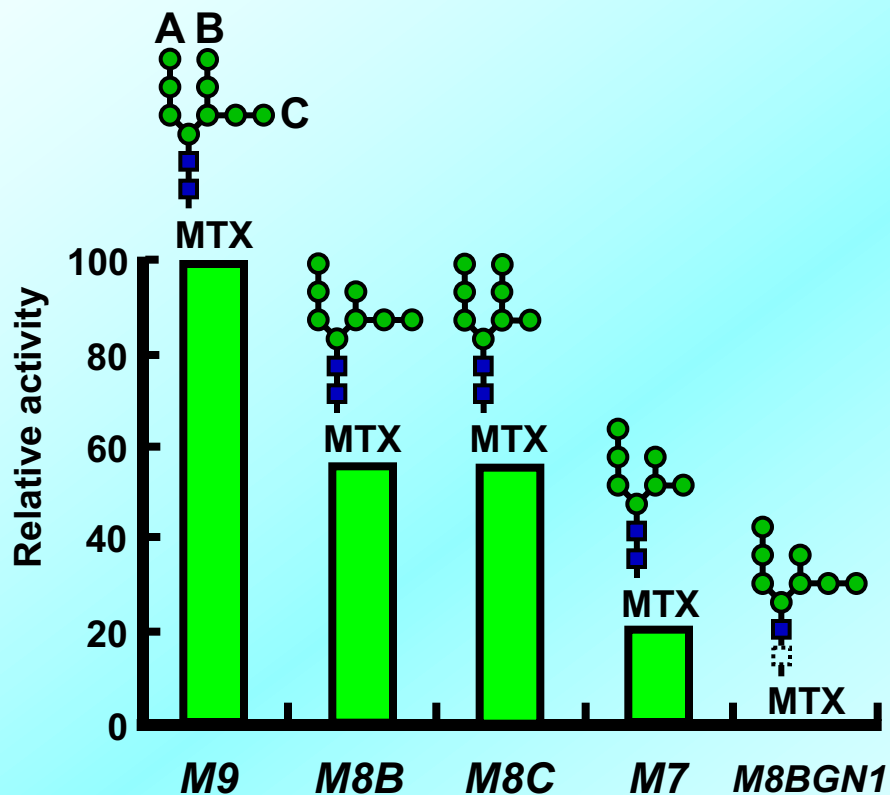
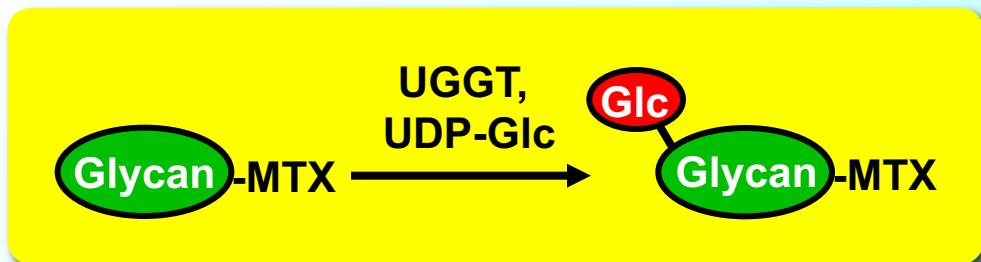
Substrate	K_m (μM)	V_{max} ($\mu mol/h/mg$)
G1M9-MTX	78	7.87
G1M8B-MTX	56	6.78
G1M8C-MTX	93	5.26
G1M7-MTX	102	5.25



- ⊠ *B-arm*末端の Man 切断は影響小
- ⊠ *C-arm*末端の Man 切断により反応効率低下



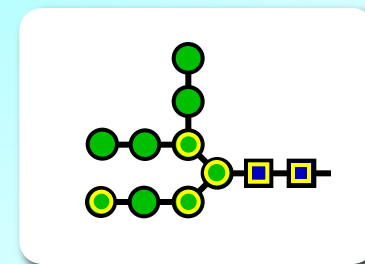
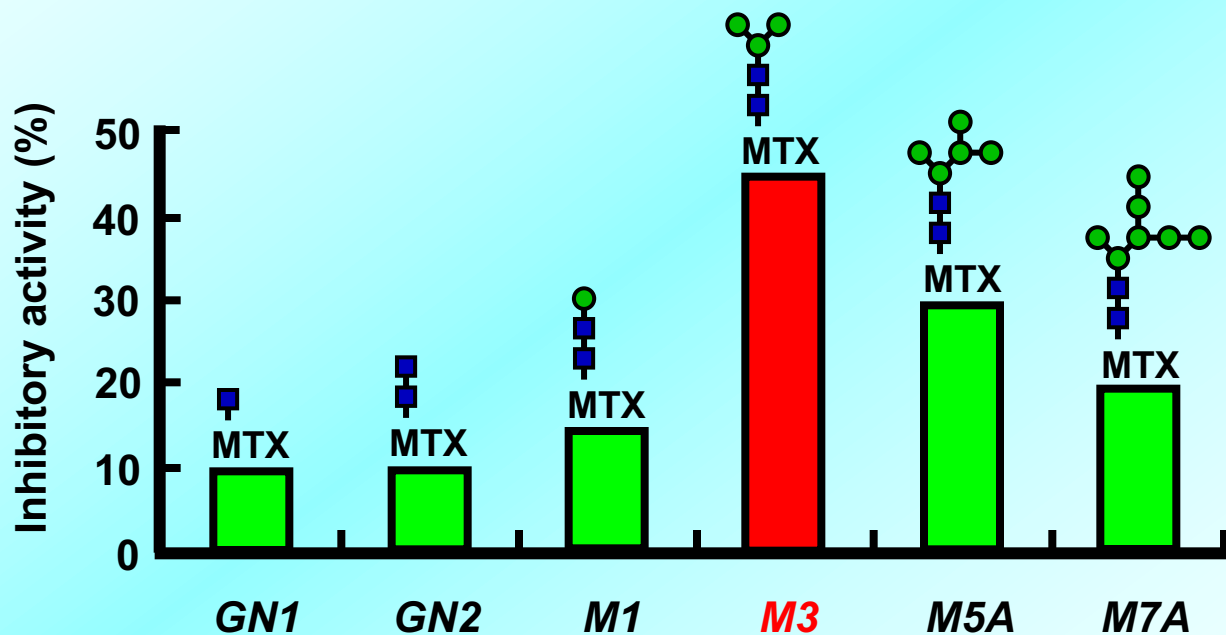
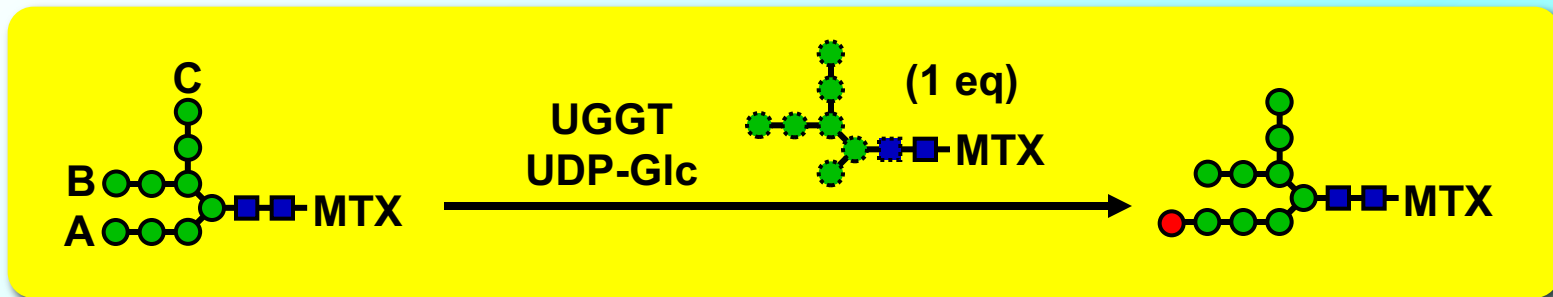
⊠ C-arm末端の Man が認識に重要



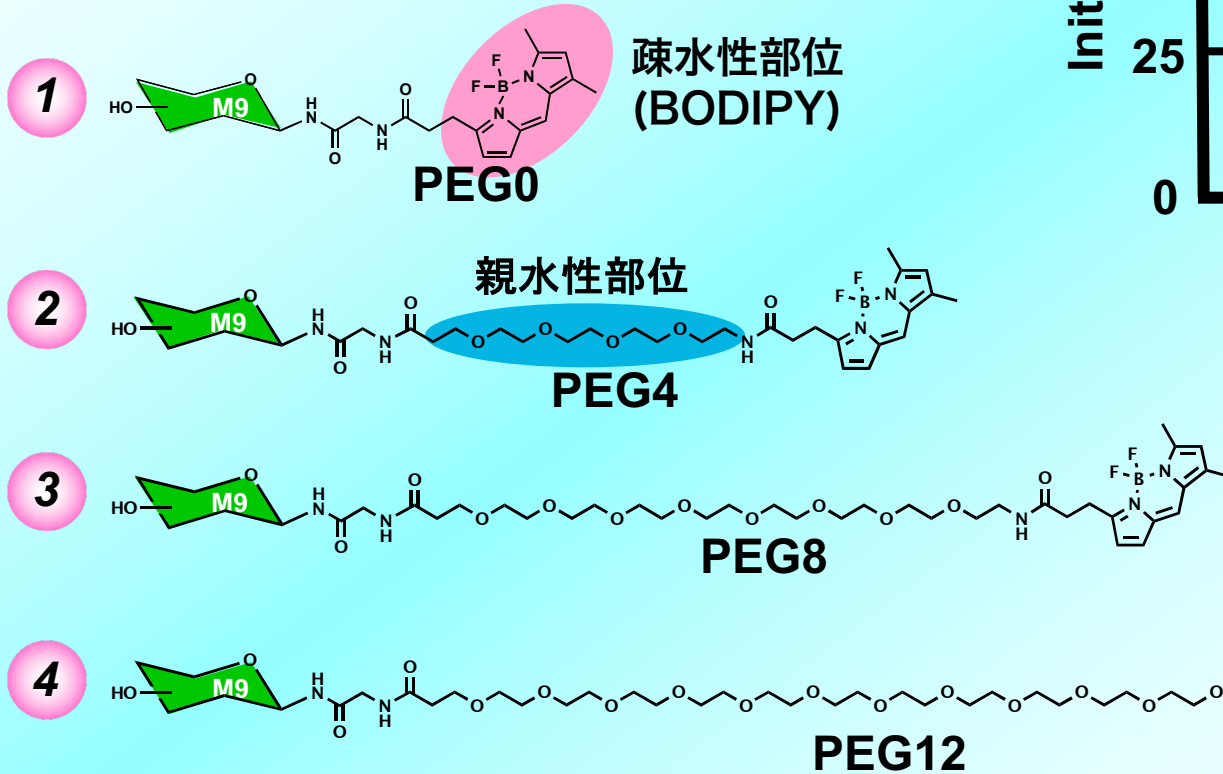
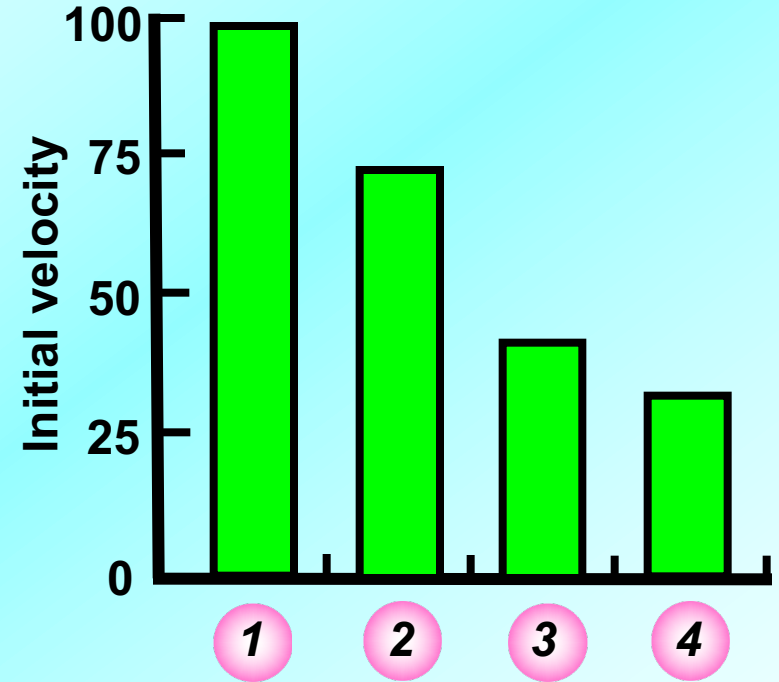
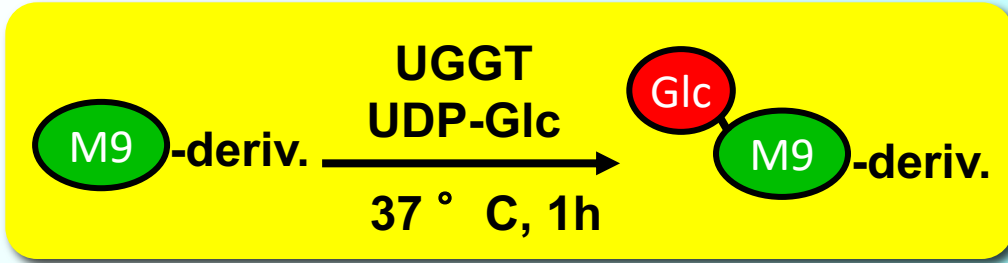
Substrate	K_m (μM)	V_{max} (nmol/h/mg)
M9-MTX	207	32.3
M8B-MTX	197	15.4
M8C-MTX	448	23.8
M7-MTX	46	4.8

☒ *B-, C-arm末端の Man 切断により 反応効率低下*

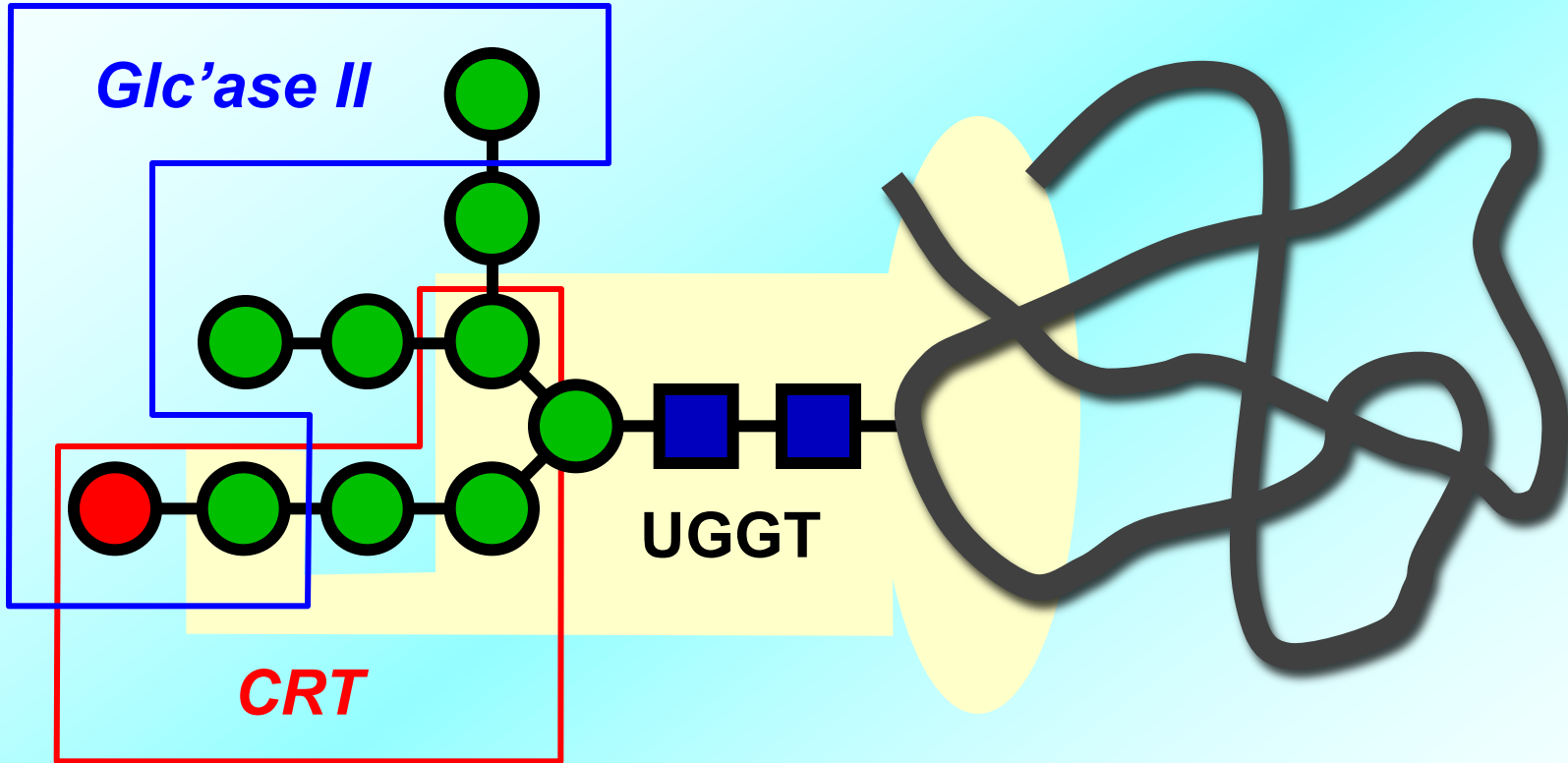
☒ *Glc-転移には GlcNAc2 が必須*



☒ *Man3GlcNAc2* 構造を強く認識



糖鎖還元末端付近の親水性向上に伴って基質認識が低下



☒ 認識部位を使い分けた巧みな品質管理